



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112012015755-8 B1



(22) Data do Depósito: 21/12/2010

(45) Data de Concessão: 22/06/2021

(54) Título: LIPÍDEO FURTIVO, E COMPOSIÇÃO

(51) Int.Cl.: A61K 9/127; A61P 35/00; A61P 1/16; A61P 43/00; A61K 9/14; (...).

(30) Prioridade Unionista: 23/12/2009 US 61/284,787.

(73) Titular(es): NOVARTIS AG.

(72) Inventor(es): JEREMY BARYZA; LAURA WEST; JUNPING ZHAO; KEITH BOWMAN; ANDREW GEALL; TANZINA FAZAL; CAMERON LEE; CHANDRA VARGESE.

(86) Pedido PCT: PCT EP2010070412 de 21/12/2010

(87) Publicação PCT: WO 2011/076807 de 30/06/2011

(85) Data do Início da Fase Nacional: 25/06/2012

(57) Resumo: LIPÍDEOS, COMPOSIÇÕES DE LIPÍDEOS, E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS. São descritos formulação e protocolos de otimização para liberação de quantidades terapeuticamente eficazes de agentes biologicamente ativos para o fígado, tumores, e/ou outras células ou tecidos. São também fornecidos composições e usos para compostos de lipídeo catiônico de fórmula (I). A invenção também se refere a composições e usos para lipídeos furtivos de fórmula (XI). São também fornecidos processos para a fabricação de tais compostos, composições, e formulações, mais métodos e usos de tais compostos, composições e formulações para liberar agentes biologicamente ativos para as células e/ou tecidos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**LIPÍDEO FURTIVO, E COMPOSIÇÃO**".

Campo da Invenção

[0001] Esta invenção se refere aos compostos lipídicos catiônicos, compostos lipídicos furtivos e às composições que compreendem tais compostos. A invenção também se refere aos processos para a produção de tais compostos e composições, e aos métodos e usos de tais compostos e composições, por exemplo, para liberar agentes biologicamente ativos para células e tecidos. A invenção descreve faixas de pKa otimizadas para lipídeos catiônicos para uso em formulações lipídicas para liberar agentes biologicamente ativos para tipos de células específicos, incluindo especialmente fígado e tumores, e métodos para otimizar as formulações.

Antecedentes da Invenção

[0002] A liberação de agentes biologicamente ativos (incluindo compostos terapeuticamente relevantes) em pacientes é frequentemente impedida por dificuldades nos compostos que alcançam a célula ou tecido alvo. Em particular, o tráfego de muitos agentes biologicamente ativos em células vivas é altamente restringido pelos sistemas de membrana complexos das células. Estas restrições podem resultar na necessidade de usar concentrações muito mais altas de agentes biologicamente ativos do que é desejável para se obter um resultado, o que aumenta o risco de efeitos tóxicos e efeitos colaterais. Uma solução para este problema é utilizar moléculas transportadoras específicas às quais é deixada a entrada seletiva na célula. Veículos lipídicos, polímeros biodegradáveis e vários sistemas conjugados podem ser usados para melhorar a liberação de agentes biologicamente ativos para as células.

[0003] Uma classe de agentes biologicamente ativos que são particularmente difíceis de liberar nas células é um produto

bioterapêutico (incluindo nucleosídeos, nucleotídeos, polinucleotídeos, ácidos nucleicos e derivados). Em geral, ácidos nucleicos são estáveis durante somente uma duração limitada em células ou plasma. O desenvolvimento de interferência de RNA, terapia de RNAi, fármacos de RNA, terapia com DNA anti-senso e terapia gênica, entre outros, aumentou a necessidade quanto a meios eficazes de introduzir os agentes de ácido nucleico ativos nas células. Por estas razões, composições que podem estabilizar e liberar agentes com base em ácido nucleico em células são de interesse particular.

[0004] Os métodos mais bem estudados para melhorar o transporte de ácidos nucleicos estranhos em células envolvem o uso de vetores virais ou lipídeos catiônicos. Vetores virais podem ser usados para transferir genes eficazmente em alguns tipos de células, mas eles geralmente não podem ser usados para introduzir moléculas quimicamente sintetizadas em células.

[0005] Uma metodologia alternativa é usar composições de liberação que incorporam lipídeos catiônicos que interagem com um agente biologicamente ativo por um lado e interagem com um sistema de membrana por outro lado (para uma revisão, veja Felgner, 1990, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 5, 162-187 e Felgner, 1993, *J. Liposome Res.*, 3, 3-16). Relata-se que tais composições contêm lipossomas.

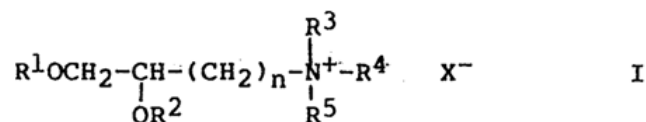
[0006] Desde a primeira descrição de lipossomas em 1965 por Bangham (*J. Mol. Biol.* 13, 238-252), tem havido um interesse e esforço constante no desenvolvimento de sistemas de veículos com base em lipídeos para a liberação de agentes biologicamente ativos. O processo de introdução de ácidos nucleicos funcionais em células cultivadas usando-se lipossomas positivamente carregados é descrito primeiro por Philip Felgner e outros *Proc. Natl. Acad. Sci., E.U.A.*, 84, 7413-7417 (1987). O processo foi demonstrado posteriormente *in vivo*

por K. L. Brigham e outros, *Am. J. Med. Sci.*, 298, 278-281 (1989).

[0007] Lipossomas são veículos atraentes uma vez que eles protegem moléculas biológicas da degradação, ao mesmo tempo em que melhoram sua absorção celular. Dentre as várias classes de lipossoma, lipossomas que contêm lipídeos catiônicos são geralmente usados para a liberação de poliânions (por exemplo, ácidos nucleicos). Tais lipossomas podem ser formados usando-se lipídeos catiônicos somente e opcionalmente incluindo-se outros lipídeos e anfífilos tais como fosfatidiletanolamina. É bem sabido na técnica que tanto a composição da formulação lipídica assim como seu método de preparação afetam a estrutura e tamanho do agregado resultante.

[0008] O uso de lipídeos catiônicos para liberação celular de agentes biologicamente ativos tem várias vantagens. O encapsulamento de compostos aniônicos que usam lipídeos catiônicos é essencialmente quantitativo devido à interação eletrostática. Além disso, acredita-se que os lipídeos catiônicos interagem com as membranas de células negativamente carregadas iniciando o transporte de membrana celular (Akhtar e outros, 1992, *Trends Cell Bio.*, 2, 139; Xu e outros, 1996, *Biochemistry* 35, 5616).

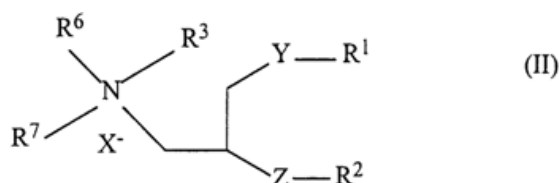
[0009] Em seguida ao trabalho inicial de Felgner sobre introdução de ácidos nucleicos funcionais em células cultivadas usando-se lipossomas positivamente carregados, compostos lipídicos catiônicos baseados na Fórmula geral I foram descritos no pedido de patente EP 0 187 702.



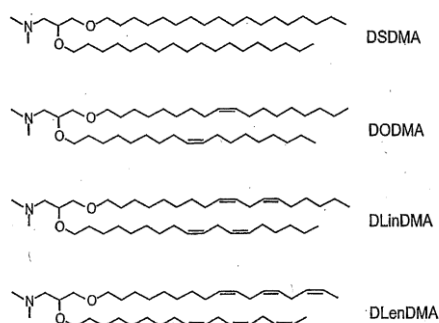
[00010] Estes compostos lipídicos catiônicos geralmente consistem em duas cadeias de alquila ou alquenila ligadas ao grupo “cabeça” contendo nitrogênio. Também há a descrição de dois ou três de R³, R⁴ e R⁵ considerados conjuntamente sendo quinuclidino, piperidino,

pirrolidino ou morfolino.

[00011] Como EP 0 187 702, vários outros pesquisadores descreveram compostos lipídicos catiônicos. Um pedido de patente relevante é WO00/030444 que descreve lipossomas e lipídeos catiônicos sintéticos. O pedido descreve compostos lipídicos catiônicos com uma variedade de grupos cabeças diferentes; alguns exemplos caracterizam mais de um grupo cabeça. Entre os compostos descritos estão compostos de Fórmula (II).

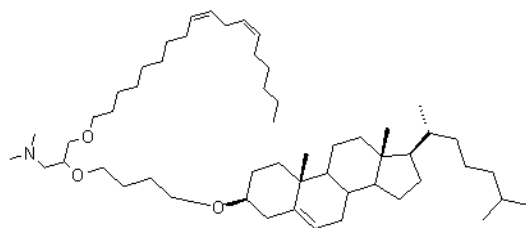


[00012] WO 2005/121348 descreve formulações de base lipídica. As partículas de lipídeo de ácido nucleico descritas neste compreendem uma molécula de RNA de interferência, um lipídeo catiônico com cadeias laterais de alquila de cerca de 10 a 20 átomos de carbono que têm mais de um único sítio de insaturação, um lipídeo não catiônico e um lipídeo conjugado que inibe a agregação da partícula tal como um conjugado de polietilenoglicol (PEG)-lipídeo ou um conjugado de poliamida (ATTA). Compostos lipídicos catiônicos específicos descritos neste pedido de patente incluem DSDMA, DODMA, DLinDMA, DLenDMA.



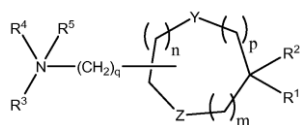
[00013] Cullis e Bailey, Biochemistry 1994, 33, 12573-12580, relatam lipossomas que compreendem lipídeos de amino como o seguinte.

[00016] US2006/0240554, US2008/0020058 e US2009/0048197 descrevem o uso do lipídeo catiônico CLinDMA, em combinação com colesterol e PEG-DAG para liberar siRNA para as células. A estrutura de CLinDMA é apresentada abaixo; na “cabeça” da molécula está o grupo -N(Me)₂. ClinDMA também é referenciado aqui como E0173.

CCCCCCCCC/C=C\CCCCCCCCCOC(CN1CCOCC1)COCCCCCCCCC/C=C\CCCCCCCCCCOC(=O)C(CCN1CCN(CC1)CC2CCCCCCCC/C=C\CCCCCCCC)COCCCCCCCC/C=C\CCCCCCCC

Petição 870210026796, de 22/03/2021, pág. 8/273

1 ou 2 heteroátomos escolhidos de nitrogênio e oxigênio):



[00018] Há uma necessidade quanto a outros lipídeos catiônicos que facilitem a liberação sistêmica e local de agentes biologicamente ativos para células. Também há uma necessidade quanto a lipídeos catiônicos que, em relação àqueles lipídeos catiônicos que são conhecidos na técnica, melhorem a liberação sistêmica e local de agentes biologicamente ativos para células. Há uma necessidade adicional quanto a formulações lipídicas que tenham características físicas otimizadas para a liberação sistêmica e local melhorada de agentes biologicamente ativos para órgãos específicos e para tumores, especialmente tumores exteriores ao fígado.

Sumário da Invenção

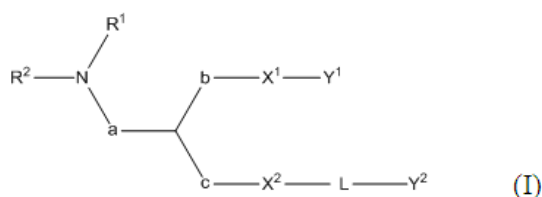
[00019] A invenção fornece novos lipídeos catiônicos e lipídeos furtivos, e formulações que os contêm, e seus métodos de uso. Também são fornecidas formulações para uso de tais lipídeos para a liberação de quantidades terapeuticamente eficazes de fármacos, incluindo especialmente construções de RNAi, para liberação ao paciente com necessidade dos mesmos. Formulações particulares que contêm lipídeos catiônicos com um pKa dentro de faixas específicas são fornecidas para administração de quantidades terapeuticamente eficazes de fármacos ao fígado e/ou à tumor nos tecidos somáticos de um paciente. Como regra geral (para a qual há exceções), as formulações que são as mais eficazes para liberação para os tumores (conforme descrito com maiores detalhes abaixo) contêm lipídeos catiônicos com um pKa de cerca de 6,1 ou abaixo, embora faixas particulares incluam de cerca de 5,0 a cerca de 6,7, incluindo especialmente de cerca de 5,2 a cerca de 6,3, ou de cerca de 5,4 a cerca de 6,2, ou de cerca de 5,8 a cerca de 6,1, dependendo do tipo

de tumor; ao passo que as formulações que são as mais eficazes para liberação para o fígado (conforme descrito com maiores detalhes abaixo) contêm lipídeos catiônicos com um pKa de cerca de 6,1 ou acima, embora faixas particulares incluam de cerca de 5,1 a cerca de 7,4, incluindo de cerca de 5,3 a cerca de 7,3, e incluindo especialmente de cerca de 5,9 a cerca de 7,0, e em uma modalidade é de cerca de 6,2 a cerca de 6,8.

[00020] As formulações podem ser também otimizadas por alguém versado na técnica ajustando-se outros aspectos da formulação, incluindo, mas não limitados a, seleção individual de, por exemplo, o pKa do lipídeo catiônico otimizado para o tipo de célula ou órgão sendo alvejado, o lipídeo catiônico usado, o lipídeo furtivo usado, o lipídeo auxiliar, o lipídeo neutro usado, inclusive se o lipídeo neutro está presente ou ausente, a relação do lipídeo auxiliar selecionado, lipídeo neutro opcional, lipídeo furtivo e lipídeo catiônico, a relação de N/P, o tamanho de partícula, o regime de dosagem, a dose administrada, o método de formulação, e outros mais.

[00021] Esta invenção fornece lipídeos catiônicos (também referidos aqui como “compostos”) e composições que compreendem tais lipídeos. A invenção também fornece processos para a produção de tais compostos e composições, e métodos e usos de tais compostos e composições para liberar agentes biologicamente ativos (inclusive terapêuticos) para as células (incluindo liberação *in vivo*) e para otimizar tais formulações para liberação *in vivo* para tipos de células e tecidos específicos. Esta invenção também fornece lipídeos furtivos.

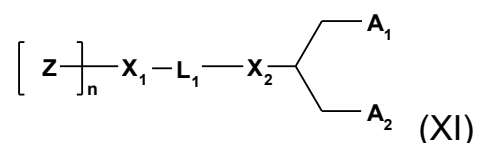
[00022] Em uma modalidade, a invenção fornece um composto de Fórmula (I):



- [00023] ou um derivado farmaceuticamente aceitável do mesmo,
- [00024] em que:
- [00025] R^1 e R^2 juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo opcionalmente substituído C_{3-20} heterocicloalquila, C_{3-20} heterocicloalquenila, C_{3-20} heterocicloalquinila ou C_{5-20} heteroarila;
- [00026] **a** está ausente ou C_{1-4} alquilenos opcionalmente substituídos;
- [00027] **b** está ausente ou C_{1-4} alquilenos opcionalmente substituídos;
- [00028] **c** está ausente ou C_{1-4} alquilenos opcionalmente substituídos;
- [00029] X^1 é O ou S;
- [00030] X^2 é O ou S;
- [00031] Y^1 é C_{10-30} alquenila, C_{10-30} alquinila, C_{10-30} heteroalquenila ou C_{10-30} heteroalquinila opcionalmente substituída;
- [00032] L está ausente ou $-(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f-$, em que
- [00033] L^a é C_{1-15} alquilenos, C_{1-15} alquenilenos, C_{1-15} alquinilenos, C_{1-15} heteroalquilenos, C_{1-15} heteroalquenilenos ou C_{1-15} heteroalquinilenos opcionalmente substituídos;
- [00034] L^b é C_{6-14} arilenos ou C_{5-13} heteroarilenos opcionalmente substituídos;
- [00035] L^c é C_{1-15} alquilenos, C_{1-15} alquenilenos, C_{1-15} alquinilenos, C_{1-15} heteroalquilenos, C_{1-15} heteroalquenilenos ou C_{1-15} heteroalquinilenos opcionalmente substituídos;
- [00036] **d** é 0 ou 1;
- [00037] **e** é 0 ou 1; e
- [00038] **f** é 0 ou 1; e
- [00039] Y^2 é um esteroide opcionalmente substituído.
- [00040] A presente invenção também fornece uma composição farmacêutica que compreende um composto de Fórmula (I). Estas composições podem compreender um agente biologicamente ativo, opcionalmente em combinação com outros componentes lipídicos.

[00041] A presente invenção também fornece uma composição farmacêutica que compreende um composto de Fórmula (XI). Estas composições podem compreender um agente biologicamente ativo, opcionalmente em combinação com outros componentes lipídicos.

[00042] Em uma modalidade, a invenção fornece um composto de Fórmula (XI):



[00043] ou um sal ou derivado farmacêuticamente aceitável do mesmo,

[00044] em que:

[00045] Z é um componente de grupo cabeça hidrofílico selecionado de PEG e polímeros baseados em poli(oxazolina), poli(óxido de etileno), poli(álcool de vinila), poli(glicerol), poli(*N*-vinila pirrolidona), poli[*N*-(2-hidroxipropil)metacrilamida] e poli(aminoácido)s, em que o polímero pode ser linear ou ramificado, e em que o polímero pode ser opcionalmente substituído;

[00046] em que Z é polimerizado por *n* subunidades;

[00047] *n* é um grau médio do número de polimerização entre 10 e 200 unidades de Z, em que *n* é otimizado para diferentes tipos de polímeros;

[00048] L₁ é um ligante de C₁₋₁₀ alquilenos ou C₁₋₁₀ heteroalquilenos opcionalmente substituído, incluindo zero, um, dois ou mais de um éter (por exemplo, -O-), éster (por exemplo, -C(O)O-), succinato (por exemplo, -O(O)C-CH₂-CH₂-C(O)O-), carbamato (por exemplo, -OC(O)-NR'-), carbonato (por exemplo, -OC(O)O-), cetona (por exemplo, -C-C(O)-C-), carbonila (por exemplo, -C(O)-), ureia (por exemplo, -NRC(O)NR'-), amina (por exemplo, -NR'-), amida (por exemplo, -C(O)NR'-), imina (por exemplo, -C(NR')-), tioéter (por exemplo, -S-), xantato (por exemplo, -OC(S)S-), e fosfodiéster (por

exemplo, $-\text{OP}(\text{O})_2\text{O}-$); qualquer um dos quais pode ser substituído por zero, um ou mais grupos Z;

[00049] em que R' é independentemente selecionado de $-\text{H}$, $-\text{NH}-$, $-\text{NH}_2$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$, um fosfato ou um C_{1-10} alquilenos opcionalmente substituído;

[00050] X^1 e X^2 são independentemente selecionados de um carbono ou um heteroátomo selecionado de $-\text{NH}-$, $-\text{O}-$, $-\text{S}-$ ou um fosfato;

[00051] A_1 e A_2 são independentemente selecionados de uma C_{6-30} alquila, C_{6-30} alquenila, e C_{6-30} alquinila, em que A_1 e A_2 podem ser iguais ou diferentes,

[00052] ou em que A_1 e A_2 juntamente com o átomo de carbono ao qual eles são ligados formam um esteroide opcionalmente substituído.

[00053] As composições que contêm os lipídeos da invenção são úteis, por exemplo, na liberação de compostos terapêuticos (por exemplo, um ou mais agentes biologicamente ativos) para o tratamento de distúrbios ou doenças, incluindo especialmente aqueles distúrbios ou doenças que respondem à modulação de expressão gênica em um paciente ou administração de um produto terapêutico a uma célula ou tecido alvejado. Como tais, os compostos e composições da presente invenção podem ser usados para tratar doenças e condições em um paciente. Em particular, os compostos podem ser utilizados em lipossomas e/ou composições de formulação de nanopartículas lipídicas para liberar os agentes biologicamente ativos, incluindo, por exemplo, anticorpos, composições de baixo peso molecular, produtos terapêuticos de proteína e composições de ácido nucleico tais como siRNA para RNAi, para células ou tecidos.

[00054] Em um método da invenção os agentes biologicamente ativos são liberados, utilizando os lipídeos catiônicos descritos, para células, durante cujo processo eles podem atravessar tecidos epiteliais

e endoteliais, tais como pele, membranas mucosas, tecidos vasculares, tecidos gastrointestinais, tecidos da barreira hematoencefálica, tecidos oftalmológicos, tecidos pulmonares, tecidos do fígado, tecidos cardíacos, tecidos do rim, tecidos tumorais, etc. Os compostos e composições podem ser usados tanto para a liberação local quanto a sistêmica dos agentes biologicamente ativos.

Descrição Detalhada da Invenção

[00055] Até esta data, o potencial terapêutico do campo do RNAi não ficou conhecido por causa de razões com liberação de quantidades terapeuticamente eficazes de composição de RNAi para a maioria dos tecidos somáticos. Produtos terapêuticos de RNAi têm alguma eficácia quando direcionados aos tecidos no olho, pele, pulmões e fígado. Uma necessidade permanece com relação à composições e métodos para liberação de quantidades terapeuticamente eficazes de RNAi para o tratamento de todos os outros tecidos somáticos e para câncer, incluindo cânceres metastáticos.

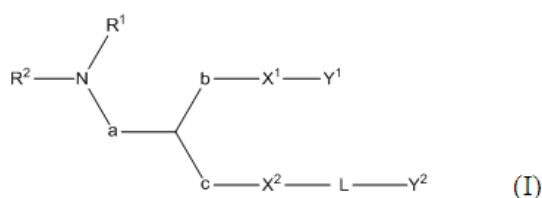
[00056] Uma constatação descrita aqui é que a faixa ótima de pKa de lipídeos catiônicos em formulações para liberação para tumores é mais baixa que aquela para o fígado. Como regra geral (para a qual há exceções), formulações com os lipídeos mais eficazes para liberação para os tumores (conforme descrito com maiores detalhes abaixo) contêm lipídeos catiônicos com um pKa de cerca de 5,0 a cerca de 6,7, incluindo especialmente de cerca de 5,8 a cerca de 6,1, dependendo do tipo de tumor, enquanto que formulações com os lipídeos mais eficazes para liberação para o fígado (conforme descrito com maiores detalhes abaixo) contêm lipídeos catiônicos com um pKa de cerca de 5,1 a cerca de 7,4, incluindo especialmente de cerca de 5,9 a cerca de 7,0. Em uma modalidade, um lipídeo catiônico com um pKa de cerca de 6,1 ou abaixo é mais eficaz em uma formulação para liberação de um agente biologicamente ativo para um tumor ou célula

de tumor; enquanto que um lipídeo catiônico com um pKa de cerca de 6,1 ou acima é mais eficaz em uma formulação para liberação de um agente biologicamente ativo para o fígado ou uma célula do fígado.

[00057] São fornecidos aqui novos lipídeos catiônicos, lipídeos furtivos, e formulações que os contêm; mais métodos de uso. Lipídeos catiônicos exemplares de uma faixa de pKa particular são descritos, onde as formulações que contêm estes lipídeos catiônicos podem liberar quantidades terapeuticamente eficazes de composições de RNAi para tumores quando administradas a um paciente *in vivo*. Outras formulações preparadas com lipídeos catiônicos de outra faixa de pKa são descritas, onde as formulações que contêm estes lipídeos catiônicos podem liberar quantidades terapeuticamente eficazes de composições de RNAi para o fígado quando administradas a um paciente *in vivo*.

Lipídeos catiônicos da invenção

[00058] Em uma modalidade, a invenção fornece um composto de Fórmula (I):



[00059] ou um derivado farmacologicamente aceitável do mesmo,

[00060] em que:

[00061] R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo opcionalmente substituído C₃₋₂₀ heterocicloalquila, C₃₋₂₀ heterocicloalquenila, C₃₋₂₀ heterocicloalquinila ou C₅₋₂₀ heteroarila;

[00062] **a** está ausente ou C₁₋₄ alquilenos opcionalmente substituídos;

[00063] **b** está ausente ou C₁₋₄ alquilenos opcionalmente substituídos;

[00064] **c** está ausente ou C₁₋₄ alquilenos opcionalmente substituídos;

[00065] X¹ é O ou S;

- [00066] X^2 é O ou S;
- [00067] Y^1 é C_{10-30} alquenila, C_{10-30} alquinila, C_{10-30} heteroalquenila ou C_{10-30} heteroalquinila opcionalmente substituído;
- [00068] L está ausente ou $-(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f-$, em que
- [00069] L^a é C_{1-15} alquilenilo, C_{1-15} alquenilenilo, C_{1-15} alquinilenilo, C_{1-15} heteroalquilenilo, C_{1-15} heteroalquenilenilo ou C_{1-15} heteroalquinilenilo opcionalmente substituído;
- [00070] L^b é C_{6-14} arileno ou C_{5-13} heteroarileno opcionalmente substituído;
- [00071] L^c é C_{1-15} alquilenilo, C_{1-15} alquenilenilo, C_{1-15} alquinilenilo, C_{1-15} heteroalquilenilo, C_{1-15} heteroalquenilenilo ou C_{1-15} heteroalquinilenilo opcionalmente substituído;
- [00072] **d** é 0 ou 1;
- [00073] **e** é 0 ou 1; e
- [00074] **f** é 0 ou 1; e
- [00075] Y^2 é um esteroide opcionalmente substituído.
- [00076] Em uma modalidade de Fórmula I, **a** é um C_{1-2} alquilenilo opcionalmente substituído. Em uma modalidade de Fórmula I, **a** é um C_1 alquilenilo opcionalmente substituído. Em uma modalidade de Fórmula I, **b** é um C_{0-2} alquilenilo opcionalmente substituído. Em uma modalidade de Fórmula I, **b** é um C_1 alquilenilo opcionalmente substituído. Em uma modalidade de Fórmula I, **c** está ausente ou é um C_1 alquilenilo opcionalmente substituído. Em uma modalidade de Fórmula I, **a**, **b** e **c** são não substituídos. Em uma modalidade de Fórmula I, **c** está ausente.
- [00077] Em uma modalidade de Fórmula I, R^1 e R^2 juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo C_{3-20} heterocicloalquila, C_{3-20} heterocicloalquenila ou C_{3-20} heterocicloalquinila opcionalmente substituído. Em uma modalidade de Fórmula I, R^1 e R^2 juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são

ligados formam um grupo C₃₋₂₀ heterocicloalquila opcionalmente substituído. Em uma modalidade de Fórmula I, R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo C₅₋₁₆ opcionalmente substituído. Em uma modalidade de Fórmula I, R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo C₅₋₁₂ opcionalmente substituído.

[00078] Em uma modalidade de Fórmula I, R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo C₅, grupo C₆ ou grupo C₇ opcionalmente substituído. Em uma modalidade de Fórmula I, R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo C₅ ou grupo C₆ opcionalmente substituído.

[00079] Em uma modalidade de Fórmula I, R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados são selecionados de H¹ a H⁵².

[00080] Em uma modalidade de Fórmula I, X¹ é O. Em uma modalidade de Fórmula I, X² é O.

[00081] Em uma modalidade de Fórmula I, L compreende pelo menos um heteroátomo. Em uma modalidade de Fórmula I, L compreende pelo menos um átomo de O. Em uma modalidade de Fórmula I, L compreende pelo menos dois heteroátomos. Em uma modalidade de Fórmula I, L compreende pelo menos duas substituições de átomos de O. Em uma modalidade de Fórmula I, L^c é um C₁₋₁₅alquilenos ou C₁₋₁₅heteroalquilenos opcionalmente substituído. Em uma modalidade de Fórmula I, L^c é selecionado de qualquer uma ou mais das Fórmulas L^{c-i} a L^{c-xxxiii}.

[00082] Em uma modalidade de Fórmula I, L^c é um C₁₋₁₅heteroalquilenos opcionalmente substituído. Em uma modalidade de Fórmula I, L^c é um grupo C₁₋₁₁ opcionalmente substituído. Em uma modalidade de Fórmula I, L^c é um grupo C₁₋₉ opcionalmente

substituído. Em uma modalidade de Fórmula I, L^c é um grupo C₃₋₈ opcionalmente substituído. Em uma modalidade de Fórmula I, L^c é um grupo C₄₋₇ opcionalmente substituído. Em uma modalidade de Fórmula I, L^c é um grupo C₅, C₆ ou C₇ opcionalmente substituído.

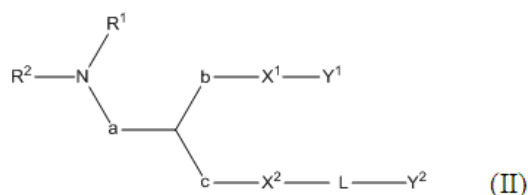
[00083] Em uma modalidade de Fórmula I, **d** é 0; **e** é 0, e **f** é 1.

[00084] Em uma modalidade de Fórmula I, Y¹ é um grupo C₁₂₋₂₈. Em uma modalidade de Fórmula I, Y¹ é um grupo C₁₄₋₂₆. Em uma modalidade de Fórmula I, Y¹ é um grupo C₁₆₋₂₄. Em uma modalidade de Fórmula I, Y¹ é um grupo C₁₆₋₂₂. Em uma modalidade de Fórmula I, Y¹ tem pelo menos um grupo alqueno. Em uma modalidade de Fórmula I, Y¹ tem 1, 2 ou 3 grupos alqueno. Em uma modalidade de Fórmula I, Y¹ tem um grupo alqueno na posição ômega-3. Em uma modalidade de Fórmula I, Y¹ tem um grupo alqueno na posição ômega-6. Em uma modalidade de Fórmula I, Y¹ tem um grupo alqueno na posição ômega-9.

[00085] Em uma modalidade de Fórmula I, Y¹ tem pelo menos um grupo alqueno cis insaturado. Em uma modalidade de Fórmula I, Y¹ tem pelo menos dois grupos alqueno cis insaturados. Em uma modalidade de Fórmula I, Y¹ tem pelo menos três grupos alqueno cis insaturados. Em uma modalidade de Fórmula I, Y¹ é selecionado de Y¹⁻ⁱ a Y^{1-vii}.

[00086] Em uma modalidade de Fórmula I, Y² é ligado a L por meio de um átomo de oxigênio no esteroide opcionalmente substituído. Em uma modalidade de Fórmula I, Y² é ligado a L por meio de um átomo de oxigênio na posição 3 do anel esteroide A. Em uma modalidade de Fórmula I, Y² é um esteroide no qual o átomo de hidrogênio do grupo hidróxi na posição 3 do anel esteroide A foi removido. Em uma modalidade de Fórmula I, o esteroide é colesterol.

[00087] Uma segunda modalidade da invenção é representada por um composto de Fórmula (II):



[00088] ou um derivado farmacêuticamente aceitável do mesmo,

[00089] em que:

[00090] R^1 e R^2 juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo opcionalmente substituído C_{3-20} heterocicloalquila, C_{3-20} heterocicloalquenila, C_{3-20} heterocicloalquinila ou C_{5-20} heteroarila;

[00091] a está ausente ou C_{1-4} alquileno opcionalmente substituído;

[00092] b está ausente ou C_{1-4} alquileno opcionalmente substituído;

[00093] c está ausente ou C_{1-4} alquileno opcionalmente substituído;

[00094] X^1 é O ou S;

[00095] X^2 é O ou S;

[00096] Y^1 é C_{10-30} alquenila, C_{10-30} alquinila, C_{10-30} heteroalquenila ou C_{10-30} heteroalquinila opcionalmente substituído;

[00097] L é $-(\text{L}^a)_d-(\text{L}^b)_e-(\text{L}^c)_f$, em que

[00098] L^a é C_{1-15} alquileno, C_{1-15} alquenileno, C_{1-15} alquinileno, C_{1-15} heteroalquileno, C_{1-15} heteroalquenileno ou C_{1-15} heteroalquinileno opcionalmente substituído;

[00099] L^b é C_{6-14} arileno ou C_{5-13} heteroarileno opcionalmente substituído;

[000100] L^c é C_{1-15} alquileno, C_{1-15} alquenileno, C_{1-15} alquinileno, C_{1-15} heteroalquileno, C_{1-15} heteroalquenileno ou C_{1-15} heteroalquinileno opcionalmente substituído;

[000101] d é 0 ou 1;

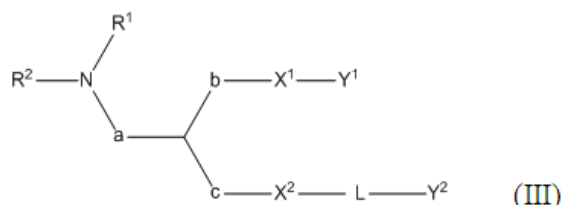
[000102] e é 0 ou 1; e

[000103] f é 0 ou 1;

[000104] com a condição de que L compreenda um ou mais heteroátomos, e

[000105] Y^2 é um esteroide opcionalmente substituído.

[000106] Uma terceira modalidade da invenção é representada por um composto de Fórmula (III):



[000107] ou um derivado farmacêuticamente aceitável do mesmo,

[000108] em que:

[000109] R^1 e R^2 juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo opcionalmente substituído C_{3-20} heterocicloalquila, C_{3-20} heterocicloalquenila, C_{3-20} heterocicloalquinila ou C_{5-20} heteroarila;

[000110] a é metileno;

[000111] b é metileno;

[000112] c está ausente;

[000113] X^1 é O ou S;

[000114] X^2 é O ou S;

[000115] Y^1 é C_{10-30} alquenila, C_{10-30} alquinila, C_{10-30} heteroalquenila ou C_{10-30} heteroalquinila opcionalmente substituído;

[000116] L é $-(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f$, em que

[000117] L^a é C_{1-15} alquileno, C_{1-15} alquenileno, C_{1-15} alquinileno, C_{1-15} heteroalquileno, C_{1-15} heteroalquenileno ou C_{1-15} heteroalquinileno opcionalmente substituído;

[000118] L^b é C_{6-14} arileno ou C_{5-13} heteroarileno opcionalmente substituído;

[000119] L^c é C_{1-15} alquileno, C_{1-15} alquenileno, C_{1-15} alquinileno, C_{1-15} heteroalquileno, C_{1-15} heteroalquenileno ou C_{1-15} heteroalquinileno opcionalmente substituído;

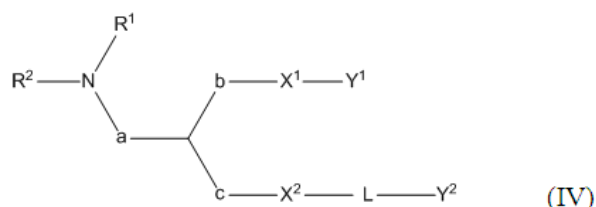
[000120] d é 0 ou 1;

[000121] e é 0 ou 1; e

[000122] f é 0 ou 1; e

[000123] Y² é um esteroide opcionalmente substituído.

[000124] Uma quarta modalidade da invenção é representada por um composto de Fórmula (IV):



[000125] ou um derivado farmacêuticamente aceitável do mesmo,

[000126] em que:

[000127] R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo opcionalmente substituído C₃₋₂₀ heterocicloalquila, C₃₋₂₀ heterocicloalquenila, C₃₋₂₀ heterocicloalquinila ou C₅₋₂₀ heteroarila;

[000128] a é metileno;

[000129] b é metileno;

[000130] c está ausente;

[000131] X¹ é O ou S;

[000132] X² é O ou S;

[000133] Y¹ é C₁₀₋₃₀alquenila, C₁₀₋₃₀alquinila, C₁₀₋₃₀heteroalquenila ou C₁₀₋₃₀heteroalquinila opcionalmente substituído;

[000134] L é -(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f, em que

[000135] L^a é C₁₋₁₅alquileno, C₁₋₁₅alquenileno, C₁₋₁₅alquinileno, C₁₋₁₅heteroalquileno, C₁₋₁₅heteroalquenileno ou C₁₋₁₅heteroalquinileno opcionalmente substituído;

[000136] L^b é C₆₋₁₄arileno ou C₅₋₁₃heteroarileno opcionalmente substituído;

[000137] L^c é C₁₋₁₅alquileno, C₁₋₁₅alquenileno, C₁₋₁₅alquinileno, C₁₋₁₅heteroalquileno, C₁₋₁₅heteroalquenileno ou C₁₋₁₅heteroalquinileno opcionalmente substituído;

[000138] d é 0 ou 1;

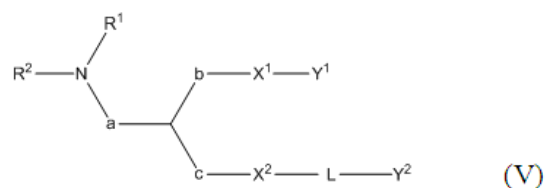
[000139] e é 0 ou 1; e

[000140] f é 0 ou 1;

[000141] com a condição de que L compreenda um ou mais heteroátomos, e

[000142] Y² é um esteroide opcionalmente substituído.

[000143] Uma quinta modalidade da invenção é representada por um composto de Fórmula (V):



[000144] ou um derivado farmacêuticamente aceitável do mesmo,

[000145] em que:

[000146] R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo opcionalmente substituído C₃₋₂₀ heterocicloalquila, C₃₋₂₀ heterocicloalquenila, C₃₋₂₀ heterocicloalquinila ou C₅₋₂₀ heteroarila;

[000147] a é metileno;

[000148] b é metileno;

[000149] c está ausente;

[000150] X¹ é O;

[000151] X² é O;

[000152] Y¹ é C₁₀₋₃₀alquenila, C₁₀₋₃₀alquinila, C₁₀₋₃₀heteroalquenila ou C₁₀₋₃₀heteroalquinila opcionalmente substituído;

[000153] L é -(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f-, em que

[000154] L^a é C₁₋₁₅alquileno, C₁₋₁₅alquenileno, C₁₋₁₅alquinileno, C₁₋₁₅heteroalquileno, C₁₋₁₅heteroalquenileno ou C₁₋₁₅heteroalquinileno opcionalmente substituído;

[000155] L^b é C₆₋₁₄ arileno ou C₅₋₁₃heteroarileno opcionalmente substituído;

[000156] L^c é C₁₋₁₅ alquileno, C₁₋₁₅ alquenileno, C₁₋₁₅ alquinileno, C₁₋₁₅

heteroalquileno, C₁₋₁₅ heteroalquenileno ou C₁₋₁₅ heteroalquinileno opcionalmente substituído;

[000157] d é 0 ou 1;

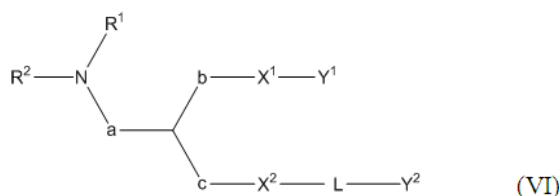
[000158] e é 0 ou 1; e

[000159] f é 0 ou 1;

[000160] com a condição de que L compreenda um ou mais heteroátomos, e

[000161] Y² é um esteroide opcionalmente substituído.

[000162] Uma sexta modalidade da invenção é representada por um composto de Fórmula (VI):



[000163] ou um derivado farmacêuticamente aceitável do mesmo,

[000164] em que:

[000165] R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo opcionalmente substituído C₃₋₂₀ heterocicloalquila, C₃₋₂₀ heterocicloalquenila, C₃₋₂₀ heterocicloalquinila ou C₅₋₂₀ heteroarila;

[000166] a é metileno;

[000167] b é metileno;

[000168] c está ausente;

[000169] X¹ é O;

[000170] X² é O;

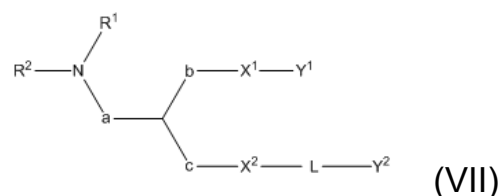
[000171] Y¹ é C₁₀₋₃₀ alquenila, C₁₀₋₃₀ alquinila, C₁₀₋₃₀ heteroalquenila ou C₁₀₋₃₀ heteroalquinila opcionalmente substituído;

[000172] L é -L^c-, em que

[000173] L^c é C₁₋₁₅ heteroalquileno, C₁₋₁₅ heteroalquenileno ou C₁₋₁₅ heteroalquinileno opcionalmente substituído; e

[000174] Y² é um esteroide opcionalmente substituído.

[000175] Uma sétima modalidade da invenção é representada por um composto de Fórmula (VII):



[000176] ou um derivado farmacêuticamente aceitável do mesmo,

[000177] em que:

[000178] R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo opcionalmente substituído C₃₋₂₀ heterocicloalquila, C₃₋₂₀ heterocicloalquenila, C₃₋₂₀ heterocicloalquinila ou C₅₋₂₀ heteroarila;

[000179] a é metileno;

[000180] b é metileno;

[000181] c está ausente;

[000182] X¹ é O;

[000183] X² é O;

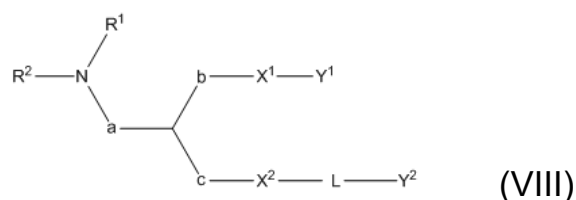
[000184] Y¹ é um grupo C₁₆₋₂₂ alquenila opcionalmente substituído;

[000185] L é -L^c-, em que

[000186] L^c é C₁₋₁₅heteroalquileno, C₁₋₁₅heteroalquenileno ou C₁₋₁₅heteroalquinileno opcionalmente substituído; e

[000187] Y² é um esteroide opcionalmente substituído.

[000188] Uma oitava modalidade da invenção é representada por um composto de Fórmula (VIII):



[000189] ou um derivado farmacêuticamente aceitável do mesmo,

[000190] em que:

[000191] R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles

são ligados formam um grupo opcionalmente substituído C_{3-20} heterocicloalquila, C_{3-20} heterocicloalquenila, C_{3-20} heterocicloalquinila ou C_{5-20} heteroarila;

[000192] a é metileno;

[000193] b é metileno;

[000194] c está ausente;

[000195] X^1 é O;

[000196] X^2 é O;

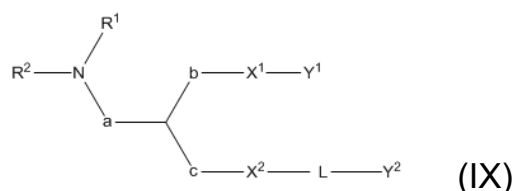
[000197] Y^1 é um grupo C_{16-22} alquenila opcionalmente substituído;

[000198] L é $-L^c-$, em que

[000199] L^c é C_{1-15} heteroalquileno, C_{1-15} heteroalquenileno ou C_{1-15} heteroalquinileno opcionalmente substituído; e

[000200] Y^2 é colesterol conectado pelo grupo hidróxi na posição 3 do anel esteroide A, estando ausente o átomo de hidrogênio do referido grupo hidróxi.

[000201] Uma nona modalidade da invenção é representada por um composto de Fórmula (IX):



[000202] ou um derivado farmacêuticamente aceitável do mesmo,

[000203] em que:

[000204] R^1 e R^2 juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo opcionalmente substituído C_{3-20} heterocicloalquila, C_{3-20} heterocicloalquenila, C_{3-20} heterocicloalquinila ou C_{5-20} heteroarila;

[000205] a é metileno;

[000206] b é metileno;

[000207] c está ausente;

[000208] X^1 é O ou S;

[000209] X^2 é O ou S;

[000210] Y^1 é C_{10-30} alquenila, C_{10-30} alquinila, C_{10-30} heteroalquenila ou C_{10-30} heteroalquinila opcionalmente substituído;

[000211] L é $-(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f$, em que

[000212] L^a é C_{1-15} alquileno, C_{1-15} alquenileno, C_{1-15} alquinileno, C_{1-15} heteroalquileno, C_{1-15} heteroalquenileno ou C_{1-15} heteroalquinileno opcionalmente substituído;

[000213] L^b é C_{6-14} arileno ou C_{5-13} heteroarileno opcionalmente substituído;

[000214] L^c é C_{1-15} alquileno, C_{1-15} alquenileno, C_{1-15} alquinileno, C_{1-15} heteroalquileno, C_{1-15} heteroalquenileno ou C_{1-15} heteroalquinileno opcionalmente substituído;

[000215] d é 0 ou 1;

[000216] e é 0 ou 1; e

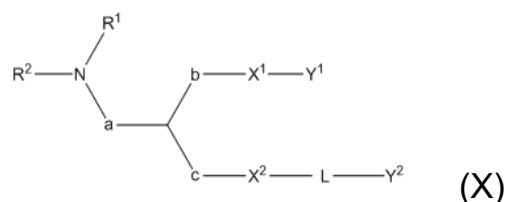
[000217] f é 0 ou 1;

[000218] com a condição de que L compreenda um ou mais heteroátomos, e

[000219] Y^2 é um esteroide opcionalmente substituído; e

[000220] em que o pKa do composto é de cerca de 5,1 a cerca de 7,4.

[000221] Uma décima modalidade da invenção é representada por um composto de Fórmula (X):



[000222] ou um derivado farmacêuticamente aceitável do mesmo,

[000223] em que:

[000224] R^1 e R^2 juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo opcionalmente substituído C_{3-20} heterocicloalquila, C_{3-20} heterocicloalquenila, C_{3-20} heterocicloalquinila

ou C₅₋₂₀ heteroarila;

[000225] a é metileno;

[000226] b é metileno;

[000227] c está ausente;

[000228] X¹ é O ou S;

[000229] X² é O ou S;

[000230] Y¹ é C₁₀₋₃₀alquenila, C₁₀₋₃₀alquinila, C₁₀₋₃₀heteroalquenila ou C₁₀₋₃₀heteroalquinila opcionalmente substituído;

[000231] L é -(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f, em que

[000232] L^a é C₁₋₁₅alquileno, C₁₋₁₅alquenileno, C₁₋₁₅alquinileno, C₁₋₁₅heteroalquileno, C₁₋₁₅heteroalquenileno ou C₁₋₁₅heteroalquinileno opcionalmente substituído;

[000233] L^b é C₆₋₁₄arileno ou C₅₋₁₃heteroarileno opcionalmente substituído;

[000234] L^c é C₁₋₁₅alquileno, C₁₋₁₅alquenileno, C₁₋₁₅alquinileno, C₁₋₁₅heteroalquileno, C₁₋₁₅heteroalquenileno ou C₁₋₁₅heteroalquinileno opcionalmente substituído;

[000235] d é 0 ou 1;

[000236] e é 0 ou 1; e

[000237] f é 0 ou 1;

[000238] com a condição de que L compreenda um ou mais heteroátomos, e

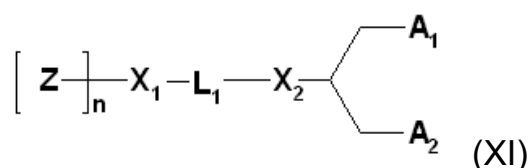
[000239] Y² é um esteroide opcionalmente substituído; e

[000240] em que o pKa do composto é de cerca de 5,0 a cerca de 6,7.

Lipídeos Furtivos

[000241] Incluídos na presente invenção estão “lipídeos furtivos” contendo um grupo cabeça hidrofílico ligado a uma porção de lipídeo. Outra caracterização de lipídeos furtivos é fornecida abaixo.

[000242] Em uma modalidade é fornecida uma composição de lipídeo furtivo de Fórmula (XI):



[000243] ou um sal ou derivado farmacêuticamente aceitável do mesmo,

[000244] em que:

[000245] Z é um componente de grupo cabeça hidrofílico selecionado de PEG e polímeros baseados em poli(oxazolina), poli(óxido de etileno), poli(álcool de vinila), poli(glicerol), poli(*N*-vinilpirrolidona), poli[*N*-(2-hidroxipropil)metacrilamida] e poli(amino-ácido)s, em que o polímero pode ser linear ou ramificado, e em que o polímero pode ser opcionalmente substituído;

[000246] em que Z é polimerizado por *n* subunidades;

[000247] *n* é um grau médio do número de polimerização entre 10 e 200 unidades de Z, em que *n* é otimizado para diferentes tipos de polímeros;

[000248] L₁ é um ligante de C₁₋₁₀ alquilenos ou C₁₋₁₀ heteroalquilenos opcionalmente substituído, incluindo zero, um, dois ou mais de um éter (por exemplo, -O-), éster (por exemplo, -C(O)O-), succinato (por exemplo, -O(O)C-CH₂-CH₂-C(O)O-), carbamato (por exemplo, -OC(O)-NR'-), carbonato (por exemplo, -OC(O)O-), cetona (por exemplo, -C-C(O)-C-), carbonila (por exemplo, -C(O)-), ureia (por exemplo, -NRC(O)NR'-), amina (por exemplo, -NR'-), amida (por exemplo, -C(O)NR'-), imina (por exemplo, -C(NR')-), tioéter (por exemplo, -S-), xantato (por exemplo, -OC(S)S-), e fosfodiéster (por exemplo, -OP(O)₂O-); qualquer um dos quais pode ser substituído por zero, um ou mais grupos Z;

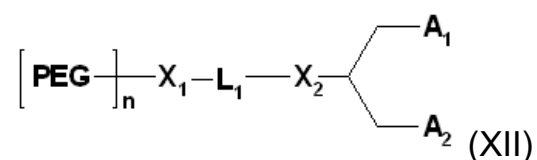
[000249] em que R' é independentemente selecionado de -H, -NH-, -NH₂, -O-, -S-, um fosfato ou um C₁₋₁₀ alquilenos opcionalmente substituído;

[000250] X^1 e X^2 são independentemente selecionados de um carbono ou um heteroátomo selecionado de $-NH-$, $-O-$, $-S-$ ou um fosfato;

[000251] A_1 e A_2 são independentemente selecionados de uma C_{6-30} alquila, C_{6-30} alquenila, e C_{6-30} alquinila, em que A_1 e A_2 podem ser iguais ou diferentes,

[000252] ou em que A_1 e A_2 juntamente com o átomo de carbono ao qual eles são ligados formam um esteroide opcionalmente substituído.

[000253] Em uma modalidade, a invenção fornece um lipídeo furtivo de Fórmula (XII)



[000254] ou um sal ou derivado farmacêuticamente aceitável do mesmo,

[000255] em que

[000256] PEG é uma subunidade de poli(etileno glicol), em que o PEG pode ser linear ou ramificado;

[000257] n é um grau médio do número de polimerização entre 10 e 200 unidades de PEG, de preferência cerca de 23 unidades, cerca de 45 unidades ou cerca de 68 unidades;

[000258] L_1 é um ligante de C_{1-10} alquileno ou C_{1-10} heteroalquileno opcionalmente substituído que contém um, dois ou mais de um éter, éster, succinato, carbamato, carbonato, cetona, carbonila, ureia, amina, amida, imina, tioéter, xantato, e fosfodiésteres; qualquer um dos quais pode ser substituído por zero, um ou mais grupos PEG;

[000259] X^1 e X^2 são independentemente selecionados de carbono ou oxigênio;

[000260] A_1 e A_2 são independentemente selecionados de uma C_{6-30} alquila, C_{6-30} alquenila, e C_{6-30} alquinila, em que A_1 e A_2 podem ser

iguais ou diferentes,

[000261] ou em que A_1 e A_2 juntamente com o átomo de carbono ao qual eles são ligados formam um esteroide opcionalmente substituído.

[000262] Os lipídeos furtivos de Fórmulas (XI) e (XII), quando formulados com, por exemplo, os lipídeos catiônicos de Fórmula (I), fornecem nanopartículas lipídicas com potência *in vivo* aumentada comparadas à lipídeos furtivos comparáveis anteriores. Por conseguinte a invenção fornece lipídeos furtivos que têm o potencial para melhorar a eficácia e a toxicidade. Providenciada com estes está uma composição que contém estes lipídeos furtivos e o uso destes lipídeos furtivos para liberar os agentes biologicamente ativos para as células.

[000263] Conforme fornecido na Tabela 8, duas nanopartículas lipídicas exemplares formuladas usando-se o mesmo processo e com composições idênticas quanto ao resto, mas sendo diferentes nos lipídeos furtivos, são liberadas para o fígado. A nanopartícula lipídica contendo o lipídeo furtivo S010 da técnica anterior e liberando um constructo de siRNA específica para o fator VII ("FVII") demonstra uma inibição *in vivo* de 72,2% quando administrada ao fígado, enquanto a nanopartícula lipídica contendo o lipídeo furtivo S006 em comparação demonstrou uma inibição do Fator VII *in vivo* de 83,8%.

[000264] Em outro exemplo fornecido na Tabela 9, com relação à liberação *in vivo* para tumores subcutâneos, seis nanopartículas lipídicas com composições idênticas quanto ao resto exceto quanto ao lipídeo furtivo/PEG são comparadas quanto à liberação eficaz de um siRNA específico para Cinase 1 do Tipo Polo ("PLK1"). A nanopartícula lipídica que contém o lipídeo furtivo S011 da técnica anterior demonstra uma inibição de PLK1 *in vivo* de 46% no tecido tumoral, enquanto nanopartículas lipídicas que contêm os lipídeos furtivos S004, S007, S009, S008, e S005 demonstram inibições de PLK1 *in vivo* de 56 %, 65%, 64%, 60%, e 52%, respectivamente, no

tecido tumoral.

[000265] Os lipídeos furtivos S001 a S009 e S012 a S026 individualmente e como uma classe desse modo demonstram características melhoradas quando usados em formulações e composição terapêutica para uso na liberação de agentes biologicamente ativos, neste caso para um ou mais siRNA.

[000266] Novos lipídeos furtivos são fornecidos na invenção. Em uma modalidade da invenção, o lipídeo furtivo é S001. Em uma modalidade, o lipídeo furtivo é S002. Em uma modalidade, o lipídeo furtivo é S003. Em uma modalidade, o lipídeo furtivo é S004. Em uma modalidade, o lipídeo furtivo é S005. Em uma modalidade, o lipídeo furtivo é S006. Em uma modalidade, o lipídeo furtivo é S007. Em uma modalidade, o lipídeo furtivo é S008. Em uma modalidade, o lipídeo furtivo é S009. Em uma modalidade, o lipídeo furtivo é S012. Em uma modalidade, o lipídeo furtivo é S013. Em uma modalidade, o lipídeo furtivo é S014. Em uma modalidade, o lipídeo furtivo é S015. Em uma modalidade, o lipídeo furtivo é S016. Em uma modalidade, o lipídeo furtivo é S017. Em uma modalidade, o lipídeo furtivo é S018. Em uma modalidade, o lipídeo furtivo é S019. Em uma modalidade, o lipídeo furtivo é S020. Em uma modalidade, o lipídeo furtivo é S021. Em uma modalidade, o lipídeo furtivo é S022. Em uma modalidade, o lipídeo furtivo é S023. Em uma modalidade, o lipídeo furtivo é S024. Em uma modalidade, o lipídeo furtivo é S025. Em uma modalidade, o lipídeo furtivo é S026.

Formulações para liberação de agentes biologicamente ativos

[000267] Em geral, enquanto na técnica anterior a eficácia dependente de tecido era controlada variando-se o lipídeo furtivo somente, nós constatamos que a eficácia com relação a um tecido particular pode surpreendentemente ser controlada variando-se o lipídeo catiônico. Como discutido abaixo, foi constatado que formulações lipídicas para a

liberação de agentes biologicamente ativos podem ser ajustadas para alvejar preferencialmente um tipo de célula ou órgão sobre outro alterando-se somente o lipídeo catiônico incluído nas formulações. Por exemplo, lipídeos catiônicos cujo pKa é cerca de 6,1 ou acima são muito mais eficazes em formulações que alvejam o fígado comparadas a formulações que contêm lipídeos catiônicos cujo pKa é cerca de 6,1 ou menor, que são comparativamente mais eficazes em formulação que alveja tumores *in vivo*. Como regra geral (para a qual há exceções), formulações com os lipídeos mais eficazes para liberação para os tumores (conforme descrito com maiores detalhes abaixo) contêm lipídeos catiônicos com um pKa de cerca de 5,0 a cerca de 6,7, incluindo especialmente de cerca de 5,2 a cerca de 6,3, ou de cerca de 5,4 a cerca de 6,2, ou de cerca de 5,8 a cerca de 6,1, dependendo do tipo de tumor; enquanto que formulações com os lipídeos mais eficazes para liberação para o fígado (conforme descrito com maiores detalhes abaixo) contêm lipídeos catiônicos com um pKa de cerca de 5,1 a cerca de 7,4, incluindo de cerca de 5,3 a cerca de 7,3, incluindo de cerca de 5,9 a cerca de 7,0, e em uma modalidade incluindo de cerca de 6,2 a cerca de 6,8.

[000268] Em uma modalidade, a otimização adicional é possível por alguém versado na técnica combinando-se lipídeos catiônicos com a faixa de pKa desejada, lipídeos furtivos, lipídeo auxiliar, lipídeos com base em resorcinol de alquila opcionais e lipídeos neutros opcionais em formulações, incluindo, por exemplo, formulações de lipossomas, formulações de liponanopartículas (LNP), e outras mais para liberação para células e tecidos *in vivo* específicos. Em uma modalidade, a otimização adicional é obtida ajustando-se a relação molar de lipídeos entre estes vários tipos de lipídeos. Em uma modalidade, a otimização adicional é obtida ajustando-se um ou mais de: o tamanho de partícula desejado, relação de N/P, métodos de formulação e/ou regime de dosagem (por exemplo, número de doses administradas ao longo do

tempo, a dose atual em mg/kg, cronometragem das doses, combinações com outros produtos terapêuticos, etc.). As várias técnicas de otimização conhecidas para aqueles versados na arte referente às modalidades listadas acima são consideradas como parte desta invenção.

[000269] Em uma modalidade, lipídeos catiônicos da invenção são fornecidos onde a formulação para liberação de quantidades terapêuticamente eficazes de agentes biologicamente ativos compreende pelo menos um de cada um dentre um lipídeo catiônico, um lipídeo auxiliar, e um lipídeo furtivo. Em uma modalidade, uma tal formulação também compreende pelo menos um lipídeo neutro. Em uma modalidade, a formulação é otimizada para liberação de um agente biologicamente ativo para liberação em um tumor. Em uma modalidade, a formulação é otimizada para liberação de um agente biologicamente ativo para liberação no fígado. Em uma modalidade, a formulação é otimizada para liberação de um tipo particular de agente biologicamente ativo. Tipos exemplares de agentes biologicamente ativos incluem, mas não estão limitados a, por exemplo, anticorpos, colesterol, hormônios, antivirais, peptídeos, polipeptídeos, proteínas, nucleoproteínas, produtos quimioterápicos, fármacos de baixo peso molecular, vitaminas, cofatores, nucleosídeos, derivados de nucleosídeo, nucleotídeos, oligonucleotídeos, ácidos nucleicos enzimáticos, ácidos nucleicos anti-senso, oligonucleotídeos de formação triplex, quimeras anti-senso 2,5-A, alozimas, aptâmeros, ribozima, moléculas de RNA iscas e análogas das mesmas, e moléculas de ácido nucleico pequenas, tais como ácido nucleico de interferência curto (siNA), RNA de interferência curto (siRNA), RNA de filamento duplo (dsRNA), micro-RNA (miRNA), e RNA curto em forma de grampo de cabelo (shRNA). Tais agentes biologicamente ativos podem ser opcionalmente otimizados com um ou mais agentes químicos e biológicos adicionais para aumentar seu valor terapêutico, por exemplo, modificações que modulam propriedades biológicas tais como, por

exemplo, estabilidade, meia-vida, potência, e/ou imunogenicidade.

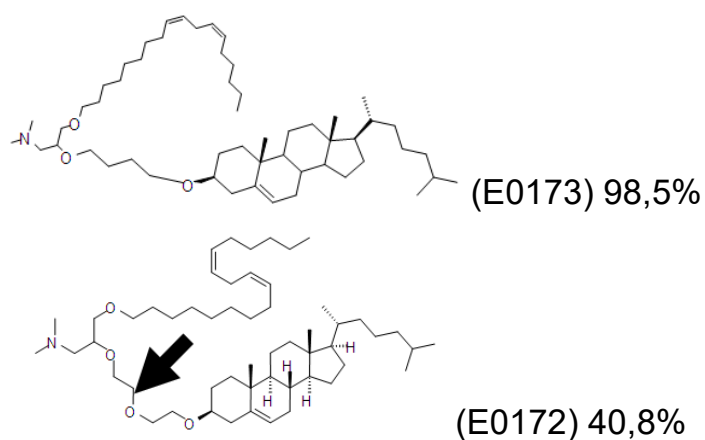
[000270] Para liberação de agentes terapêuticos para tumores, formulações preferidas são selecionadas daquelas que liberam quantidades suficientes de um agente biologicamente ativo para modular eficazmente a atividade do alvo terapêutico em um paciente com necessidade de tal administração.

[000271] Onde o agente biologicamente ativo é um constructo de RNAi, uma quantidade eficaz de um RNAi, siRNA, siNA, ou shRNA é a quantidade que fornece uma redução (KD) de pelo menos 20% ou maior, 50% ou maior, 60% ou maior, 70% ou maior, 75% ou maior, 80% ou maior, 85% ou maior, 90% ou maior, 95% ou maior, ou até 100% do mRNA alvo expresso na célula alvo. Em geral, a escolha de qual faixa de KD terapeuticamente relevante é necessária para tratamento eficaz pode variar de acordo com a série de reações sendo alvejada, de acordo com o tipo de célula ou tecido, e/ou de acordo com a doença ou distúrbio sendo tratado.

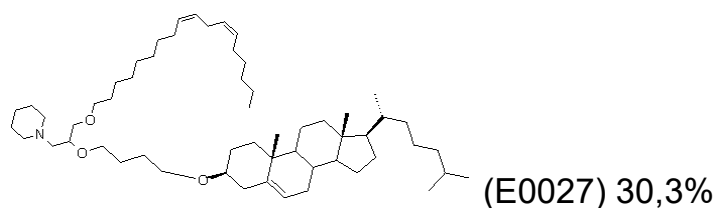
[000272] Lipídeos catiônicos do tipo descrito acima, em que R^1 e R^2 juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um “grupo cabeça” cíclico, são apresentados aqui como sendo lipídeos catiônicos eficazes para uso em formulações lipídicas. Além disso, é relatado atualmente que a presença do grupo cabeça cíclico altera inesperadamente o comportamento de uma formulação lipídica e, em particular, que altera a influência dos outros substituintes.

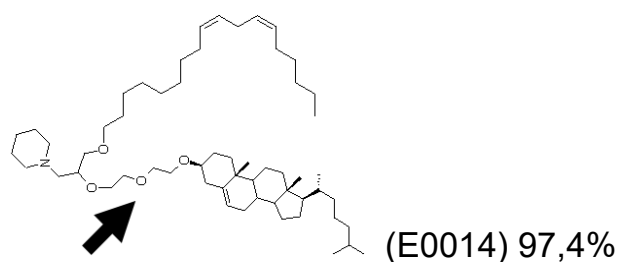
[000273] O grupo cabeça (isto é, R^1 -N- R^2) dos compostos de lipídeo catiônico da invenção contém um grupo de amina terciária. Esta característica causa os compostos comportarem-se diferentemente, por exemplo, de se eles tiveram, por exemplo, grupos de amina quaternária (catiônicos) por que a quaternização do nitrogênio coloca uma carga fixa sobre o átomo, removendo sua sensibilidade ao pH e causando um composto comportar-se muito diferentemente.

[000274] Em um caso específico, a presença de grupo cabeça cíclico em compostos inventivos E0027 e E0014 alteraram a capacidade do lipídeo catiônico como um todo para agir como um agente de liberação eficaz em uma formulação quando comparado com lipídeos E0173 e E0172, que diferem apenas no grupo cabeça. Por exemplo, como descrito em maiores detalhes abaixo, uma formulação contendo um lipídeo catiônico particular (E0173, CLinDMA) com o grupo cabeça -N(Me)₂, quando usado em uma formulação para a liberação de um constructo de RNAi específico para o Factor VII, demonstra uma inibição de Fator VII *in vivo* de 98,5%. Quando aquele composto é modificado substituindo o substituinte de L alquilenos com um substituinte de L heteroalquilenos (marcado com uma seta abaixo), a atividade do composto (E0172) é constatada diminuir: uma inibição de Factor VII *in vivo* de 40,8% é encontrada.



[000275] Ao contrário, os presentes inventores constataram que, quando o grupo cabeça cíclico está presente, mudando o L alquilenos para um substituinte de L heteroalquilenos tem o efeito oposto; a eficácia do composto aumenta. Por exemplo:





[000276] Desse modo, uma modalidade da invenção compreende aqueles compostos em que L compreende um ou mais heteroátomos. A pessoa versada não alcançaria êxito em tais compostos iniciando da descrição de CLinDMA por que, como mencionado acima, a pessoa versada iniciando de compostos com um grupo cabeça CLinDMA constataria que um grupo L compreendendo dois ou mais heteroátomos reduz a eficácia dos compostos finais, e desse modo não forneceriam um composto que compreende tal grupo.

[000277] Sem desejar ser ligado por qualquer teoria, uma possibilidade é que a eficácia das formulações de lipídeo da invenção está relacionada com o pKa. O pKa de um lipídeo catiônico pode ser ajustado alterando-se a estrutura, por exemplo, variando o número de heteroátomos em L ou variando a natureza do grupo cabeça.

[000278] Em um exemplo, referindo-se aos experimentos de siRNA *in vivo*, por exemplo, na Tabela 8, usando as formulações mencionadas acima (contendo lipídeos catiônicos E0172, E0171, E0027 e E0014) que resultaram em inibições do Factor-VII no fígado de 98,5%, 40,8%, 30,3% e 97,4% respectivamente, seus valores pKa são constatados serem 6,7, 8,5, 5,7 e 6,4, respectivamente.

[000279] Com respeito à liberação de agentes para o fígado, para uma modalidade da invenção, é suposto que, como uma norma geral (para a qual existem exceções), os lipídeos catiônicos mais eficazes para uso em tais formulações têm um pKa de cerca de 5,1 a cerca de 7,4. Em uma modalidade, lipídeos catiônicos com um pKa de cerca de 5,3 a cerca de 7,3 são fornecidos para a formulação desta invenção para liberação do fígado. Em uma modalidade, lipídeos catiônicos com

um pKa de cerca de 5,9 a cerca de 7,0 são fornecidos para a formulação desta invenção para liberação do fígado. Em uma modalidade, lipídeos preferidos têm uma faixa de pKa de cerca de 6,2 a cerca de 6,8 para uso em formulação para liberação de agentes biologicamente ativos para o fígado.

[000280] Uma surpreendente constatação da invenção é que tecidos de tumor têm diferentes faixas de pKa ideais para eficácia. Desse modo, as faixa de pKa no parágrafo anterior aplicam-se à extensão em que os lipídeos são pretendidos para liberar agentes biologicamente ativos para as células do fígado.

[000281] Com respeito à liberação de agentes biologicamente ativos para um tumor, é suposto que, como uma norma geral (para a qual existem exceções), os lipídeos catiônicos mais eficazes da invenção para uso em tais formulações têm um pKa de cerca de 5,0 a cerca de 6,7, e desse modo são lipídeos preferidos para liberação para tumores em uma modalidade.

[000282] Em uma modalidade geral, lipídeos catiônicos com um pKa de cerca de 5,0 a cerca de 6,7 são fornecidos para a formulação desta invenção para uso em liberação de agentes biologicamente ativos para um ou mais tumores. Em uma modalidade, lipídeos catiônicos com um pKa de cerca de 5,2 a cerca de 6,3 são fornecidos para a formulação desta invenção para uso em liberação de agentes biologicamente ativos para um ou mais tumores. Em uma modalidade, lipídeos catiônicos com um pKa de cerca de 5,4 a cerca de 6,2 são fornecidos para a formulação desta invenção para uso em liberação de agentes biologicamente ativos para um ou mais tumores. Em uma modalidade, lipídeos catiônicos com um pKa de cerca de 5,8 a cerca de 6,1 são fornecidos para a formulação desta invenção para uso em liberação de agentes biologicamente ativos para um ou mais tumores.

[000283] Em uma modalidade, o lipídeo catiônico usado na

formulação tem um pKa otimizado para liberação de um agente biologicamente ativo para um tumor particular ou Tipo de célula. Os tipos de tumor podem ser tumores primários ou podem ser metastáticos.

[000284] Em uma modalidade específica, as formulações otimizadas para liberação para tumores semelhantes a Hep3B contêm lipídeos catiônicos com um pKa de cerca de 5,0 a cerca de 6,7. Em uma modalidade específica, formulações otimizadas para liberação para tumores semelhantes a Hep3B contêm lipídeos catiônicos com um pKa de cerca de 5,3 a cerca de 6,3. Em uma modalidade específica, formulações otimizadas para liberação para tumores semelhantes a Hep3B contêm lipídeos catiônicos com um pKa de cerca de 5,4 a cerca de 5,9. Em uma modalidade específica, formulações otimizadas para liberação para tumores semelhantes a Hep3B contêm lipídeos catiônicos com um pKa de cerca de 5,8 a cerca de 5,9.

[000285] Em uma modalidade específica, formulações otimizadas para liberação para Tumores semelhantes a HepG2 contêm lipídeos catiônicos com um pKa de cerca de 5,2 a cerca de 6,2. Em uma modalidade específica, formulações otimizadas para liberação para tumores semelhantes a Hep3B contêm lipídeos catiônicos com um pKa de cerca de 5,3 a cerca de 6,2. Em uma modalidade específica, formulações otimizadas para liberação para tumores semelhantes a Hep3B contêm lipídeos catiônicos com um pKa de cerca de 5,6 a cerca de 6,1. Em uma modalidade específica, formulações otimizadas para liberação para Tumores semelhantes a HepG2 contêm lipídeos catiônicos com um pKa de cerca de 6,1.

[000286] Em uma modalidade específica, formulações otimizadas para liberação para tumores renais semelhantes a 786-0, ou suas metástases, contêm lipídeos catiônicos com um pKa de cerca de 6,1.

[000287] É razoável postular que outros tecidos, indicações, tipos de

tumor ou vias de administração podem possuir faixas de pKa de lipídeo preferidas. Para lipossoma ou formulações de LNP, é também razoável postular que vários tecidos, indicações, tipos de tumor ou vias de administração podem possuir faixas de pKa de lipídeo catiônico preferidas, relações N/P, tamanho de partícula, lipídeo catiônico usado, lipídeo furtivo usado, lipídeo auxiliar usado, uso opcional de um lipídeo neutro selecionado, relações molares relativas de cada componente de lipídeo, método de formulação, agente biologicamente ativo a ser liberado, e regime de dosagem incluindo dose administrada. A otimização de cada destes aspectos, independentemente ou de uma maneira coordenada, é descrita abaixo, e muitos aspectos específicos de tal otimização acredita-se incluírem-se na capacidade de alguém versado na técnica sem requerer experimentação indevida.

[000288] Formulações podem ser otimizadas por alguém versado na técnica ajustando outros aspectos da formulação, incluindo, porém não limitado à seleção individual de, por exemplo, o pKa do lipídeo catiônico otimizado para o tipo de célula ou órgão que está sendo alvejado; o lipídeo catiônico usado; o lipídeo furtivo usado; o lipídeo auxiliar usado; se um lipídeo neutro estiver presente ou ausente; a escolha de lipídeo neutro usado se presente; a relação molar do lipídeo auxiliar selecionado, lipídeo neutro opcional, lipídeo furtivo e lipídeo catiônico; a relação N/P; o tamanho de partícula; o regime de dosagem; a dose administrada; o método de formulação; e similares.

Modalidades dos compostos de Fórmulas (I) a (X)

a, b and c

[000289] Em uma modalidade, **a** é C₁₋₂ alquilenos opcionalmente substituído. Em uma modalidade, **a** é C₁ alquilenos opcionalmente substituído.

[000290] Em uma modalidade, **b** é C₀₋₂ alquilenos opcionalmente substituído. Em uma modalidade, **b** é C₁ alquilenos opcionalmente substituído.

[000291] Em uma modalidade, **c** está ausente ou é C₁ alquilenos opcionalmente substituído. Em uma modalidade, **c** é ausente.

[000292] Em uma modalidade, **a**, **b** e **c** são, se presentes, não substituídos.

O grupo cabeça para lipídeos catiônicos

[000293] Em uma modalidade, R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo C₃₋₂₀ heterocicloalquila opcionalmente substituído, C₃₋₂₀-heterocicloalquenila, C₃₋₂₀-heterocicloalquinila, grupo C₅-heteroarila ou C₆-heteroarila. Em uma modalidade, R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um Grupo C₃₋₂₀ heterocicloalquila opcionalmente substituído, C₃₋₂₀ heterocicloalquenila ou C₃₋₂₀ heterocicloalquinila. Em uma modalidade, R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo C₃₋₂₀ heterocicloalquila opcionalmente substituído.

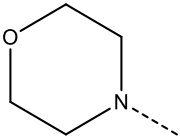
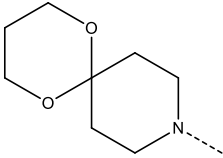
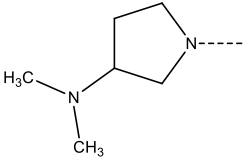
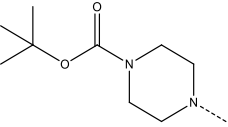
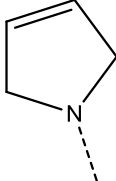
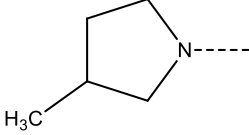
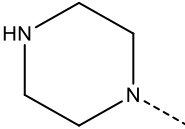
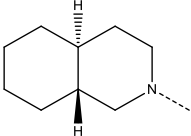
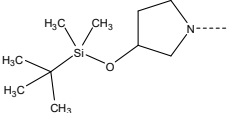
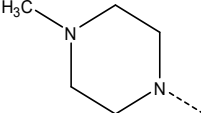
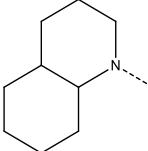
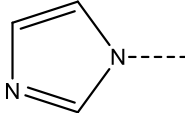
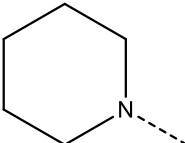
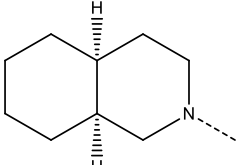
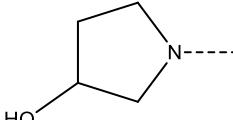
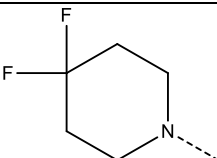
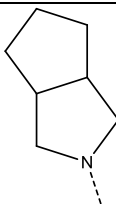
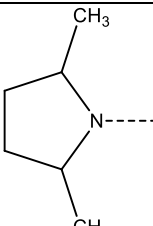
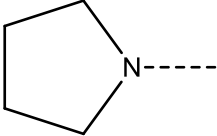
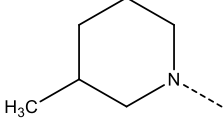
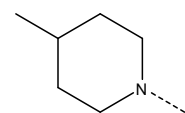
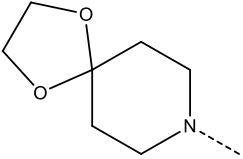
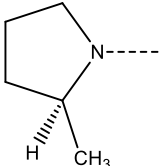
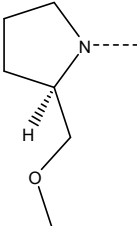
[000294] Em uma modalidade, R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo C₅₋₁₆ cíclico opcionalmente substituído. Em uma modalidade, R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo C₅₋₁₂ opcionalmente substituído. Em uma modalidade, R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um opcionalmente substituído grupo C₅ cíclico, grupo C₆ cíclico ou grupo C₇ cíclico. Em uma modalidade, R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um opcionalmente substituído grupo C₅ cíclico ou grupo C₆ cíclico.

[000295] Em uma modalidade desta invenção, R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam uma espécie cíclica que compreende pelo menos um átomo de oxigênio.

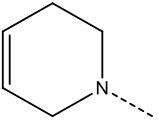
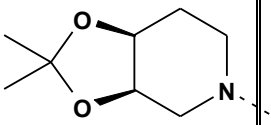
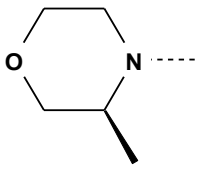
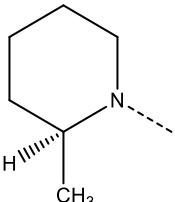
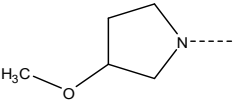
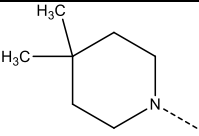
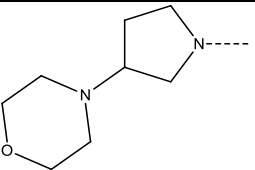
[000296] Em uma modalidade, R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados são selecionados de pelo menos

um dos grupos cabeça H^1 a H^{52} como fornecido na Tabela 1.

Tabela 1 – Porções denominadas H^1 a H^{52}

	Estrutura		Estrutura		Estrutura
H^1		H^1_9		H^{37}	
H^2		H^2_0		H^{38}	
H^3		H^2_1		H^{39}	
H^4		H^2_2		H^{40}	
H^5		H^2_3		H^{41}	
H^6		H^2_4		H^{42}	
H^7		H^2_5		H^{43}	
H^8		H^2_6		H^{44}	

H ⁹		H ² ₇		H ⁴⁵	
H ¹⁰		H ² ₈		H ⁴⁶	
H ¹¹		H ² ₉		H ⁴⁷	
H ¹²		H ³ ₀		H ⁴⁸	
H ¹³		H ³ ₁		H ⁴⁹	
H ¹⁴		H ³ ₂		H ⁵⁰	
H ¹⁵		H ³ ₃		H ⁵¹	

H ¹⁶		H ³ ₄		H ⁵²	
H ¹⁷		H ³ ₅			
H ¹⁸		H ³ ₆			

pKa para lipídeos catiônicos

[000297] Em uma modalidade, lipídeos catiônicos aqui com faixas de pKa na faixa desejada são preferidos, incluindo especialmente para formulações para liberação de agentes biologicamente ativos.

[000298] Como mencionado acima, e mostrado abaixo, um lipídeo catiônico com um pKa de cerca de 5,1 a cerca de 7,4 é geralmente eficaz quando usado em uma formulação para alvejar o fígado. Em uma modalidade, o pKa de um lipídeo catiônico é de cerca de 5,1 a cerca de 7,4 para liberação para o fígado. Em uma modalidade, um lipídeo catiônico com um pKa de cerca de 5,3 a cerca de 7,3 para uso em formulações específicas para alvejar o fígado. Desse modo, em uma modalidade, o pKa de um lipídeo catiônico é de cerca de 5,3 a cerca de 7,3 para liberação para o fígado. Em uma modalidade, o pKa de um lipídeo catiônico é de cerca de 5,9 a cerca de 7,0 para liberação para o fígado. Em uma modalidade, o pKa do lipídeo catiônico é de cerca de 6,2 a cerca de 6,8 para liberação para o fígado.

[000299] Como mencionado acima e ilustrado experimentalmente abaixo, um lipídeo catiônico com um pKa de cerca de 5,0 a cerca de 6,7 é particularmente eficaz quando usado em uma formulação para liberação de um agente biologicamente ativo para um tumor. Desse

modo, em uma modalidade, o pKa de um lipídeo catiônico é de cerca de 5,0 a cerca de 6,7 para liberação para tumores. Em uma modalidade, o pKa de um lipídeo catiônico é de cerca de 5,2 a cerca de 6,3 para liberação para tumores. Em uma modalidade, o pKa de um lipídeo catiônico é de cerca de 5,4 a cerca de 6,2 para liberação para tumores. Em uma modalidade, o pKa do lipídeo catiônico é de cerca de 5,8 a cerca de 6,1 para liberação para tumores. Em uma modalidade geral, o pKa de um lipídeo catiônico é de cerca de 6,1 ou abaixo para liberação de um agente biologicamente ativo para um tumor ou célula de tumor.

[000300] O pKa do lipídeo catiônico para uso em uma formulação para liberação de um agente biologicamente ativo pode ser também otimizado dependendo do tipo de tumor. Por exemplo, como fornecido nas Tabelas 9, 10 e 11, construções de RNAi específicas para mRNA de PLK1 são diferencialmente liberadas para tumores renais Hep3B, HepG2 e 786-0 injetadas no flanco de um camundongo, de uma maneira que se correlaciona com o pKa do lipídeo catiônico na formulação de LNP. Em outra análise, é evidente que a faixa de pKa ideal para redução de PLK1 em tumores Hep3B *in vivo* difere da faixa de pKa ideal para tumores HepG2 e 786-0, embora ambas as faixas incluam-se na faixa geral de 5,0 a 6,7 como listado no parágrafo acima, e todas as faixas em geral incluem lipídeos catiônicos com um pKa menor do que é ideal para liberação para o fígado.

[000301] Portanto, em uma modalidade para liberação de um agente biologicamente ativo para tumores semelhantes a Hep3B *in vivo*, os lipídeos catiônicos da invenção têm faixas de pKa de cerca de 5,0 a cerca de 6,7. Em uma modalidade, o pKa de um lipídeo catiônico é de cerca de 5,3 a cerca de 6,3 para liberação para tumores semelhantes a Hep3B. Em uma modalidade, o pKa de um lipídeo catiônico é de cerca de 5,4 a cerca de 5,9 para liberação para tumores semelhantes

a Hep3B. Em uma modalidade, o pKa de um lipídeo catiônico é de cerca de 5,8 a cerca de 5,9 para liberação para tumores semelhantes a Hep3B.

[000302] Além disso, em uma modalidade para liberação de um agente biologicamente ativo para tumores semelhantes a HepG2 *in vivo*, os lipídeos catiônicos da invenção têm faixas de pKa de cerca de 5,2 a cerca de 6,2. Em uma modalidade, o pKa de um lipídeo catiônico é de cerca de 5,3 a cerca de 6,2 para liberação para tumores semelhantes a HepG2. Em uma modalidade, o pKa de um lipídeo catiônico é de cerca de 5,6 a cerca de 6,1 para liberação para tumores semelhantes a HepG2. Em uma modalidade, o pKa de um lipídeo catiônico é de cerca de 6,1 para tumores semelhantes a HepG2 ou para tumores semelhantes a tumor renal 786-0.

X^1 e X^2

[000303] Em uma modalidade, X^1 é O. Em outra modalidade, X^2 é O. Em uma modalidade, ambos X^1 e X^2 são O.

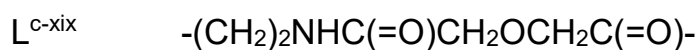
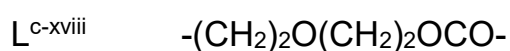
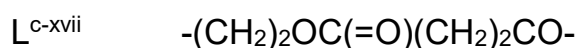
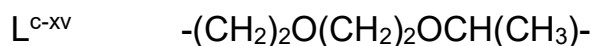
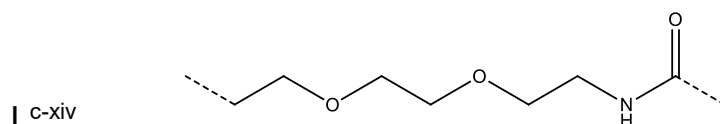
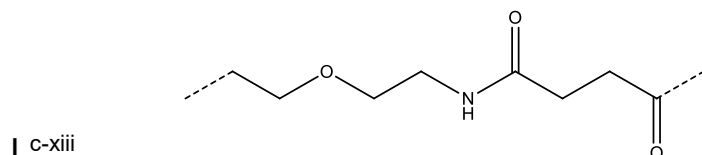
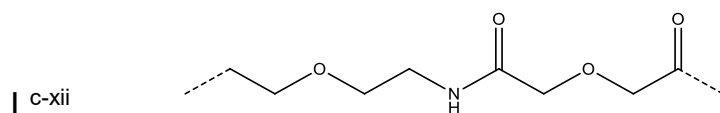
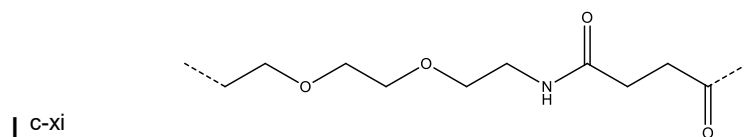
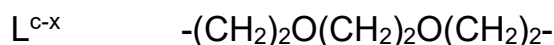
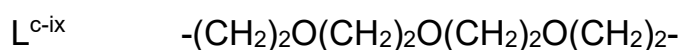
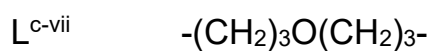
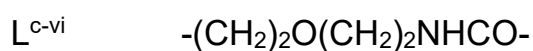
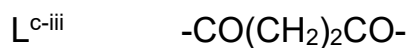
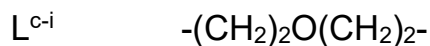
Ligante

[000304] Em uma modalidade, L compreende pelo menos um heteroátomo. Isto significa que a cadeia que fornece uma ligação direta entre X^2 e Y^2 tem pelo menos um heteroátomo. Em outras palavras, qualquer heteroátomo em um substituinte sobre L não vale para estes propósitos. Em uma modalidade, L compreende pelo menos um átomo O.

[000305] Em uma modalidade, L compreende pelo menos dois heteroátomos. Em uma modalidade, L compreende pelo menos dois átomos de O.

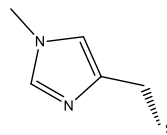
[000306] Em uma modalidade, L^c é opcionalmente substituído C_{1-15} alquilenos ou C_{1-15} heteroalquilenos. Em uma modalidade, L^c é opcionalmente substituído C_{1-15} alquilenos ou C_{1-15} heteroalquilenos e **d** e **e** são ambos zero (0).

[000307] Em uma modalidade, L^c é selecionado de uma das Fórmulas L^{c-i} a $L^{c-xxxiii}$. Em uma modalidade, L^c é selecionado de uma das Fórmulas L^{c-i} a $L^{c-xxxiii}$ e **d** e **e** são ambos zero (0).



L^{C-xxii} $-(\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})-$

L^{C-xxiii} $-(\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})\text{CH}(\text{side-chain-1})\text{NHC}(=\text{O})-$, em que cadeia



lateral-1 representa o grupo, a linha tracejada representando a ligação ao resto da molécula;

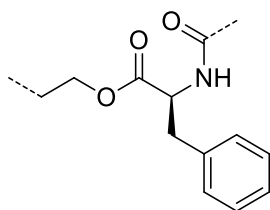
L^{C-xxiv} $-(\text{CH}_2)_2\text{OC}(=\text{O})-$

L^{C-xxv} $-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_2-$

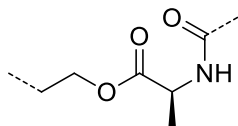
L^{C-xxvi} $-(\text{CH}_2)_2\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_2-$

L^{C-xxvii} $-(\text{CH}_2)_2\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{O})-$

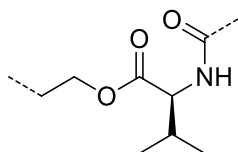
L^{C-xxviii} $-(\text{CH}_2)_2\text{OC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_2\text{NHC}(=\text{O})-$



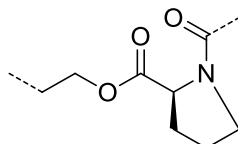
L^{C-xxix}



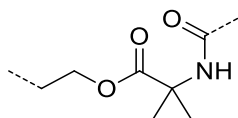
L^{C-xxx}



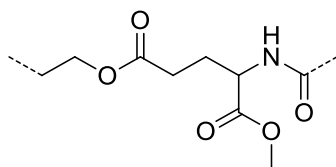
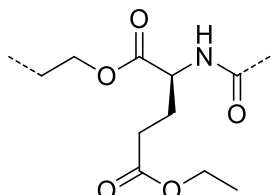
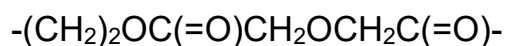
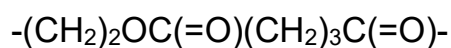
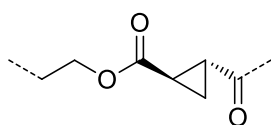
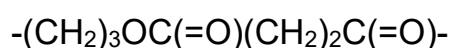
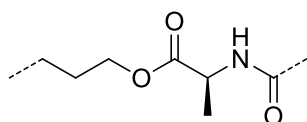
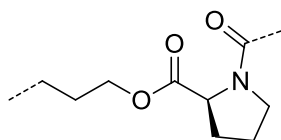
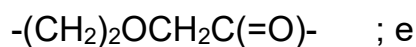
L^{C-xxxi}



L^{C-xxxii}



L^{C-xxxiii}

L^{C-xxxiv}L^{C-xxxv}L^{C-xxxvi}L^{C-xxxvii}L^{C-xxxviii}L^{C-xxxix}L^{C-xxxx}L^{C-xxxxi}L^{C-xxxxii}L^{C-xxxxiii}

[000308] Visto que grupos em que L compreende pelo menos um heteroátomo são preferidos, L^c é preferivelmente selecionado de L^{C-i}, L^{C-iv} a L^{C-vii} e L^{C-ix} a L^{C-xxxxiii}.

[000309] Em uma modalidade, L^c é C₁₋₁₅heteroalquileno opcionalmente substituído.

[000310] Em uma modalidade, L^c é um grupo C_{1-11} opcionalmente substituído. Em uma modalidade, L^c é um grupo C_{1-9} opcionalmente substituído. Em uma modalidade, L^c é um grupo C_{3-8} opcionalmente substituído. Em uma modalidade, em que L^c é um grupo C_{4-7} opcionalmente substituído. Em uma modalidade, L^c é um grupo C_5 , C_6 ou C_7 opcionalmente substituído.

[000311] Em uma modalidade, **d** é 0; **e** é 0, e **f** é 1. Em uma modalidade, **d** é 0; **e** é 0, e **f** é 1 e L^c é, dentro dos comprimentos de cadeia mencionados acima, heteroalquileno.

Y¹ para lipídeos catiônicos

[000312] Em uma modalidade, Y^1 é um grupo C_{12-28} . Em uma modalidade, Y^1 é um grupo C_{14-26} opcionalmente substituído. Em uma modalidade, Y^1 é um grupo C_{16-24} opcionalmente substituído. Em uma modalidade, Y^1 é um grupo C_{16-22} opcionalmente substituído. Em uma modalidade, a cadeia Y^1 opcionalmente substituída é de 18, 19, 20 ou 21 átomos de comprimento.

[000313] Dentro das faixas de carbono mencionadas acima, Y^1 é preferivelmente alquenila ou heteroalquenila.

[000314] Em uma modalidade, Y^1 tem pelo menos um grupo alqueno. Em uma modalidade, Y^1 tem 1, 2 ou 3 grupos alqueno.

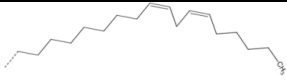
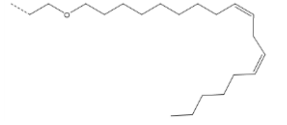
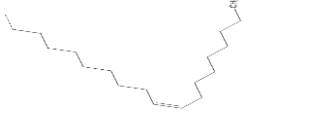
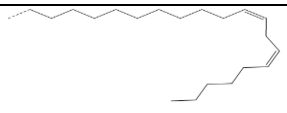
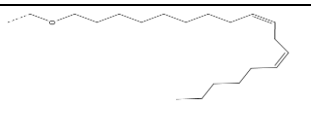
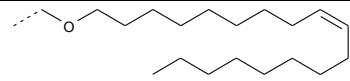
[000315] Em uma modalidade, Y^1 tem um grupo alqueno na posição ômega-3. Em outra modalidade, Y^1 tem um grupo alqueno na posição ômega-6. Em outra modalidade, Y^1 tem um grupo alqueno na posição ômega-9. Em uma modalidade, Y^1 tem um grupo alqueno em duas ou três das posições ômega-3, ômega-6 e ômega-9. Em uma modalidade, Y^1 é insaturado nas posições ômega-6 e ômega-9. Em outra modalidade, Y^1 é insaturado nas posições ômega-3, ômega-6 e ômega-9. Em uma modalidade, Y^1 é insaturado na posição ômega-9.

[000316] Em uma modalidade, Y^1 tem pelo menos um grupo alqueno cis insaturado. Em uma modalidade, Y^1 has pelo menos dois grupos

alqueno cis insaturado. Em uma modalidade, Y^1 tem pelo menos três grupos alquenos cis insaturados. O pelo menos um grupo alqueno cis insaturado pode ser em uma, duas ou três das posições de ômega-3, ômega-6 e ômega-9. A insaturação em cadeias de lipídeo é descrita em MacLachlan e outro, Journal of Controlled Release 107 (2005) 276-287.

[000317] Em uma modalidade Y^1 é selecionado de Y^{1-i} a Y^{1-vii} como fornecido na Tabela 2.

Tabela 2. Posições relacionadas com Y^1 denominadas Y^{1-i} a Y^{1-vii}

Nome	Estrutura	Nome	Estrutura
Y^{1-i}		Y^{1-ii}	
Nome	Estrutura	Nome	Estrutura
Y^{1-iii}		Y^{1-iv}	
Nome	Estrutura	Nome	Estrutura
Y^{1-v}		Y^{1-vi}	
Nome	Estrutura		
Y^{1-vii}			

Y^2

[000318] Em uma modalidade, Y^2 é ligado a L por meio de um átomo de oxigênio no esteroide opcionalmente substituído. Em uma modalidade, Y^2 é ligado a L por meio de um átomo de oxigênio na posição 3 do anel de esteroide **A**. Em uma modalidade Y^2 é um esteroide em que o átomo de hidrogênio do grupo hidróxi na posição 3 do anel esteroide A foi removido (e a conexão a L é através do átomo de oxigênio do referido grupo hidróxi).

[000319] Em uma modalidade o referido esteroide é selecionado do

grupo que consiste em:

anasterol;	avenasterol;	beta-sitosterol;	brassicasterol;
calciferol;	campesterol;	calinosterol;	quinasterol;
colestanol;	colesterol;	coprostanol;	cicloartenol;
desidrocolesterol;	desmosterol;	di-hidrocalciferol;	di-
hidrocolesterol;			
di-hidroergosterol;		dinosterol;	epicolesterol;
	ergosterol;		
fucosterol;	hexa-hidrolumisterol;		hexaol;
	hidroxicolesterol;		
lanosterol;	lumisterol;	parqueol;	poriferasterol;
saringosterol;	sitostanol;	sitosterol;	estigmastanol;
estigmasterol;	weinbersterol;	zimosterol;	

um ácido de bÍlis de esterol (tal como ácido cólico; ácido quenodeoxicólico; ácido glicocólico; ácido taurocólico; ácido desoxicólico, e ácido litocólico);

e/ou um sal farmacêuticamente relevante ou um derivado farmacêuticamente aceitável do mesmo.

[000320] Em uma modalidade, o esterol é colesterol.

LipÍdeos específicos para uso em liberação de um agente biologicamente ativo

[000321] Os novos lipÍdeos catiônicos e lipÍdeos furtivos da invenção podem ser usados para a liberação de agentes terapêuticamente aceitáveis incluindo, por exemplo, agentes biologicamente ativos. Formulações contendo lipÍdeos catiônicos, lipÍdeos furtivos, e outros tipos de lipÍdeos são descritas em toda esta descrição. Visto que os lipÍdeos descritos aqui são acreditados novos e Úteis, certas características são preferidas sobre outras para uso terapêutico, como detalhado também na descrição exemplar e não ligada fornecida abaixo. Em uma modalidade, as lipossomas, nanopartÍcula de lipÍdeo

ou outra tal formulação de lipídeo também compreende um agente biológico eficaz. Em uma modalidade, a lipossoma, nanopartícula de lipídeo ou outra tal formulação de lipídeo é vazia.

[000322] Em uma modalidade, os componentes de lipídeo separados para uso em uma formulação são fornecidos em um kit. Em uma modalidade, os kits contêm instruções para geração da formulação de lipídeo. O kit pode compreender uma formulação pronta para uso ou componentes separados ou parciais que requerem misturar antes da administração. Um kit pode também fornecer componentes adicionais, tais como, porém não limitados a, controles, tampões, recipientes, e componentes de liberação, ou podem ser limitados àqueles lipídeos e componentes inventivos como descrito aqui.

[000323] Em uma modalidade, o kit contém pelo menos uma lipossoma ou componentes de lipossoma incluindo, porém não limitados a um ou mais de um lipídeo catiônico, um lipídeo furtivo, um lipídeo auxiliar, e/ou um lipídeo neutro opcional. Em uma modalidade, os kits também compreendem um agente biologicamente ativo. Em uma modalidade, o kit também compreende um ou mais lipídeos de controle, ou agentes de controle, uma formulação de lipossoma de controle, manchas, tampões, e instruções para uso, e similares. Em uma alternativa, a formulação de lipossoma é pré-misturada. Um ou mais dos componentes químicos do kit podem ser fornecidos em uma forma desidratada ou em uma forma hidratada. Qualquer dos vários métodos conhecidos na técnica para desidratação em liofilização dos vários compostos e composições descritas aqui pode ser usado.

[000324] Em um aspecto da invenção, é fornecido qualquer um dos compostos específicos exemplificados abaixo ou um derivado farmacologicamente aceitável do mesmo.

[000325] Em uma modalidade, o composto é para liberação de um agente biologicamente ativo para o fígado e o composto é selecionado

de um ou mais de E0024, E0014, E0052, E0118, E0175, E0177 ou E0083. Em uma modalidade, uma composição para liberação de um agente biologicamente ativo para o fígado compreende um ou mais dos compostos selecionados de E0024, E0014, E0052, E0118 ou E0083. Em uma modalidade, uma composição para liberação de um agente biologicamente ativo para o fígado compreende o composto E0024. Em uma modalidade, uma composição para liberação de um agente biologicamente ativo para o fígado compreende composto E0014. Em uma modalidade, uma composição para liberação de um agente biologicamente ativo para o fígado compreende composto E0052. Em uma modalidade, uma composição para liberação de um agente biologicamente ativo para o fígado compreende composto E0118. Em uma modalidade, uma composição para liberação de um agente biologicamente ativo para o fígado compreende o composto E0083.

[000326] Em uma modalidade, o composto é para liberação de um agente biologicamente ativo para um tumor e o composto é selecionado de um ou mais de E0011, E0008, E0025, E0026, E0076, E0077, E0085 ou E0088. Em uma modalidade, uma composição para liberação de um agente biologicamente ativo para um tumor compreende um ou mais dos compostos selecionados de E0011, E0008, E0025, E0026, E0076, E0077, E0085 ou E0088. Em uma modalidade, uma composição para liberação de um agente biologicamente ativo para um tumor compreende composto E0011. Em uma modalidade, uma composição para liberação de um agente biologicamente ativo para um tumor compreende composto E0008. Em uma modalidade, uma composição para liberação de um agente biologicamente ativo para um tumor compreende composto E0025. Em uma modalidade, uma composição para liberação de um agente biologicamente ativo para um tumor compreende composto E0026. Em

uma modalidade, uma composição para liberação de um agente biologicamente ativo para um tumor compreende composto E0076. Em uma modalidade, uma composição para liberação de um agente biologicamente ativo para um tumor compreende composto E0077. Em uma modalidade, uma composição para liberação de um agente biologicamente ativo para um tumor compreende composto E0085. Em uma modalidade, uma composição para liberação de um agente biologicamente ativo para um tumor compreende composto E0088.

[000327] Liposomas, nanopartículas de lipídeo e outras tais formulações de lipídeo contendo um ou mais dos lipídeos descritos aqui são úteis para liberação de composições de ácido nucleico para uma célula ou tecido, *in vitro* ou *in vivo*. Composições de ácido nucleico terapeuticamente relevante incluem agentes de RNAi que são específicos para um ou mais genes associados com uma doença ou distúrbio, em que o alvejamento da sequência endógena na célula ou tecido com o agente de RNAi limita-se a um efeito terapêutico ou profilático.

[000328] Como uma norma de não ligação geral, quantidades terapeuticamente eficazes de inibição alvo para liberação de agentes biologicamente ativos, incluindo especialmente agentes de RNAi, resultam em inibição alvo de pelo menos 70% onde o alvo é expresso no fígado. Em uma modalidade, lipídeos catiônicos da invenção fornecem pelo menos 70% de inibição alvo quando fornecidos em uma formulação para liberação de um RNAi para o fígado. Lipídeos catiônicos que fornecem pelo menos 70% KD quando formulados para o fígado incluem, porém não estão limitados a, E0007, E0008, E0011, E0014, E0015, E0016, E0017, E0018, E0019, E0022, E0024, E0025, E0026, E0032, E0034, E0040, E0042, E0043, E0045, E0048, E0049, E0051, E0052, E0053, E0054, E0055 e E0118. Em uma modalidade, lipídeos catiônicos da invenção fornecem pelo menos 80% de inibição

alvo quando fornecido em uma formulação para liberação de um RNAi para o fígado. Lipídeos catiônicos que fornecem pelo menos 80% KD quando formulados para o fígado incluem, porém não estão limitados a, E0008, E0011, E0014, E0016, E0017, E0018, E0019, E0022, E0024, E0025, E0026, E0032, E0034, E0040, E0042, E0043, E0045, E0048, E0052, E0053, E0054, E0055 e E0118. Em uma modalidade, lipídeos catiônicos da invenção fornecem pelo menos 90% de inibição alvo quando fornecido em uma formulação para liberação de um RNAi para o fígado. Lipídeos catiônicos que fornecem pelo menos 90% KD quando formulados para o fígado incluem, porém não estão limitados a, E0011, E0014, E0017, E0018, E0024, E0025, E0026, E0040, E0043, E0045, E0052, E0053, E0054, E0055 e E0118. Em uma modalidade, lipídeos catiônicos da invenção fornecem pelo menos 95% de inibição alvo quando fornecido em uma formulação para liberação de um RNAi para o fígado. Lipídeos catiônicos que fornecem pelo menos 95% KD quando formulados para o fígado incluem, porém não estão limitados a, E0014, E0017, E0018, E0024, E0026, E0040, E0043, E0052, E0054, E0055 e E0118. Em uma modalidade, lipídeos catiônicos da invenção fornecem pelo menos 98% de inibição alvo quando fornecido em uma formulação para liberação de um RNAi para o fígado. Lipídeos catiônicos que fornecem pelo menos 98% KD quando formulados para o fígado incluem, porém não estão limitados a, E0014, E0017, E0018, E0024, E0052, E0054 e E0118.

[000329] Como uma norma de não ligação geral, quantidades terapeuticamente eficazes de inibição alvo para liberação de agentes biologicamente ativos, incluindo especialmente agentes de RNAi, resultam em inibição alvo de pelo menos 50% onde o alvo é um tumor. Em uma modalidade, lipídeos catiônicos da invenção fornecem pelo menos 50% de inibição alvo quando fornecido em uma formulação para liberação de um RNAi para um tumor ou células de tumor.

Lipídeos catiônicos que fornecem pelo menos 50% KD quando formulados para tumores ou células de tumor incluem, porém não estão limitados a, E0008, E0011, E0025, E0026, E0075, E0076, E0077, E0085, E0088, E0095, E0104, E0178 e E0179. Em uma modalidade, lipídeos catiônicos da invenção fornecem pelo menos 60% de inibição alvo quando fornecido em uma formulação para liberação de um RNAi para um tumor ou células de tumor. Lipídeos catiônicos que fornecem pelo menos 60% KD quando formulados para tumores ou células de tumor incluem, porém não estão limitados a, E0008, E0011, E0025, E0026, E0075, E0076, E0077, E0085 e E0088. Em uma modalidade, lipídeos catiônicos da invenção fornecem pelo menos 70% de inibição alvo quando fornecidos em uma formulação para liberação de um RNAi para um tumor ou células de tumor. Lipídeos catiônicos que fornecem pelo menos 70% KD quando formulados para tumores ou células de tumor incluem, porém não estão limitados a, E0011, E0025, E0026, E0075, E0076, E0077 e E0088. Em uma modalidade, lipídeos catiônicos da invenção fornecem pelo menos 80% de inibição alvo quando fornecido em uma formulação para liberação de um RNAi para o tumor para um tumor ou células de tumor. Lipídeos catiônicos que fornecem pelo menos 80% KD quando formulados para tumores ou células de tumor incluem, porém não estão limitados a, E0008, E0025 e E0076.

[000330] Em uma modalidade específica, quantidades terapêuticamente eficazes de inibição alvo para liberação de agentes biologicamente ativos, incluindo especialmente agentes de RNAi, resultam em inibição alvo de pelo menos 30% onde o alvo é um tumor semelhante a HepG2 ou um tumor semelhante a 786-0. Em uma modalidade específica, lipídeos catiônicos da invenção fornecem pelo menos 30% de inibição alvo quando fornecido em uma formulação para liberação de um RNAi, para um tumor semelhante a HepG2 ou

um tumor semelhante a 786-0, e incluem E0056, E0076, E0085, E0104, E0175, E0176 e E0177. Em uma modalidade específica, lipídeos catiônicos da invenção fornecem pelo menos 30% de inibição alvo quando fornecido em uma formulação para liberação de um RNAi para um tumor semelhante a HepG2 ou um tumor semelhante a 786-0, e incluem E0085, E0175 e E0177.

Lipídeos catiônicos específicos para liberação para o fígado

[000331] Em uma modalidade, um lipídeo catiônico preferido é E0014. Em uma modalidade, um lipídeo catiônico preferido é E0017. Em uma modalidade, um lipídeo catiônico preferido é E0018. Em uma modalidade, um lipídeo catiônico preferido é E0024. Em uma modalidade, um lipídeo catiônico preferido é E0052. Em uma modalidade, um lipídeo catiônico preferido é E0054. Em uma modalidade, um lipídeo catiônico preferido é E0118.

[000332] Em uma modalidade, uma formulação preferida para liberação de um agente biologicamente ativo para o fígado contém um lipídeo catiônico com um pKa de cerca de 5,1 a cerca de 7,4. Em uma modalidade, uma formulação preferida para liberação de um agente biologicamente ativo para o fígado contém um lipídeo catiônico com um pKa de cerca de 5,3 a cerca de 7,3. Em uma modalidade, uma formulação preferida para liberação de um agente biologicamente ativo para o fígado contém um lipídeo catiônico com um pKa de cerca de 5,9 a cerca de 7,0. Em uma modalidade, uma formulação preferida para liberação de um agente biologicamente ativo para o fígado contém um lipídeo catiônico com um pKa de cerca de 6,2 a cerca de 6,8. Em uma modalidade, uma formulação preferida para liberação de um agente biologicamente ativo para o fígado contém um lipídeo catiônico com um pKa de cerca de 6,1 ou maior.

Lipídeos catiônicos específicos para liberação para tumores

[000333] Em uma modalidade, um lipídeo catiônico preferido é

E0008. Em uma modalidade, um lipídeo catiônico preferido é E0025. Em uma modalidade, um lipídeo catiônico preferido é E0076. Em uma modalidade, um lipídeo catiônico preferido é E0085. Em uma modalidade, um lipídeo catiônico preferido é E0175. Em uma modalidade, um lipídeo catiônico preferido é E0177.

[000334] Em uma modalidade, uma formulação preferida para liberação de um agente biologicamente ativo para um tumor *in vivo* contém um lipídeo catiônico com um pKa de cerca de 5,0 a cerca de 6,7. Em uma modalidade, uma formulação preferida para liberação de um agente biologicamente ativo para um tumor *in vivo* contém um lipídeo catiônico com um pKa de cerca de 5,2 a cerca de 6,3. Em uma modalidade, uma formulação preferida para liberação de um agente biologicamente ativo para um tumor *in vivo* contém um lipídeo catiônico com um pKa de cerca de 5,4 a cerca de 6,2. Em uma modalidade, uma formulação preferida para liberação de um agente biologicamente ativo para um tumor *in vivo* contém um lipídeo catiônico com um pKa de cerca de 5,8 a cerca de 6,1. Em uma modalidade, uma formulação preferida para liberação de um agente biologicamente ativo para um tumor ou célula de tumor contém um lipídeo catiônico com um pKa de cerca de 6,1 ou menor.

Composições e formulações farmacêuticas

[000335] A presente invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos um lipídeo catiônico composto da invenção. A presente invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo pelo menos um lipídeo furtivo composto da invenção. Em uma modalidade, pelo menos um outro componente de lipídeo está presente. Tais composições podem também conter um agente biologicamente ativo, opcionalmente em combinação com um ou mais outros componentes de lipídeo. Em uma modalidade, o um ou mais componentes, composições e/ou agentes são fornecidos em um kit.

Composições contendo lipídeos da invenção em combinação com um ou mais agentes biologicamente ativos em uma modalidade são fornecidos como formulações para uso, por exemplo, na liberação de quantidades terapeuticamente eficazes de um ou mais agentes biologicamente ativos para uma célula ou tecido. Em uma modalidade, a célula ou tecido está em um indivíduo em necessidade de tratamento ou profilaxia. Em uma modalidade, o indivíduo é um paciente em necessidade de quantidades terapeuticamente eficazes do agente biologicamente ativo. Como usado aqui, indivíduos incluem ambos animais humanos e não humanos.

[000336] O(s) outro(s) componente(s) de lipídeo pode(m) ser um ou mais selecionados do grupo que consiste em lipídeos catiônicos, lipídeo neutros (opcionais), lipídeo auxiliares, lipídeos furtivos e lipídeos com base em alquil resorcinol. Em uma modalidade, a invenção fornece uma composição compreendendo: (a) um lipídeo catiônico, por exemplo, compostos de qualquer uma das Fórmulas I a X, e/ou E0001-E0171 e E0175-E0180 da invenção; (b) um lipídeo neutro opcional, por exemplo, DSPC; (c) um lipídeo auxiliar, por exemplo, um contendo colesterol; (d) um lipídeo furtivo, por exemplo, um de ou Fórmula XI ou XII ou qualquer um ou mais de S001-S009 e S012-S026, ou 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi (polietileno glicol)-2000] (catálogo # 880150P de Avanti Polar Lipids). Em uma modalidade, os componentes de lipídeo são em uma formulação de lipossoma, por exemplo, uma nanopartícula ou similar. Em uma modalidade, a formulação de lipossoma também compreende um agente biologicamente ativo. Em uma modalidade, a formulação de lipossoma também compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente biologicamente ativo.

[000337] O(s) outro(s) componente(s) de lipídeo podem, por exemplo, ser um ou mais selecionados do grupo de lipídeos catiônicos

conhecidos consistindo em cloreto de N,N-dioleil-N,N-dimetilamônio (DODAC), brometo de N,N-diesteraril-N,N-dimetilamônio (DDAB), cloreto de N-(1-(2,3-dioleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamônio (DOTAP), cloreto de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamônio (DOTMA), N,N-dimetil-2,3-dioleiloxi)propilamina (DODMA), 1,2-Dioleoil-3-Dimetilamônio-propano (DODAP), 1,2-Dioleoilcarbamil-3-Dimetilammonium-propano (DOCDAP), 1,2-Dilíneoil-3-Dimetilammonium-propano (DLINDAP), dilauril(C_{12:0}) trimetil amônio propano (DLTAP),

Dioleoiloxi-N-[2-sperminecarboxamido)etil}-N,N-dimetil-1-propanamíniutrimfluoroacetato (DOSPA), Dioctadecilamidoglicil espermina (DOGS), DC-Chol, brometo de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidroxietil amônio (DMRIE), 3-Dimetilamino-2-(Colest-5-en-3-beta-oxibutan-4-oxi)-1--(cis,cis-9,12-octadecadienoxi)propano (CLinDMA), 2-[5'-(colest-5-em-3[beta]-oxi)-3'-oxapentoxi)-3-dimetil-1-(cis,cis-9',12'-octadecadienoxi)-propano (CpLinDMA) e N,N-Dimetil-3,4-dioleiloxibenzilamina (DMOBA), dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE), 1,2-N,N'-Dioleilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DOcarbDAP). Em uma modalidade o(s) outro(s) componente(s) de lipídeo é DOTAP ou DLTAP.

[000338] Em uma modalidade, o lipídeo catiônico é selecionado de um lipídeo de Fórmula I. Em uma modalidade, o lipídeo catiônico é selecionado de um lipídeo de Fórmula II. Em uma modalidade, o lipídeo catiônico é selecionado de um lipídeo de Fórmula III. Em uma modalidade, o lipídeo catiônico é selecionado de um lipídeo de Fórmula IV. Em uma modalidade, o lipídeo catiônico é selecionado de um lipídeo de Fórmula V. Em uma modalidade, o lipídeo catiônico é selecionado de um lipídeo de Fórmula VI. Em uma modalidade, o lipídeo catiônico é selecionado de um lipídeo de Fórmula VII. Em uma modalidade, o lipídeo catiônico é selecionado de um lipídeo de Fórmula VIII. Em uma modalidade, o lipídeo catiônico é selecionado de

um lipídeo de Fórmula IX. Em uma modalidade, o lipídeo catiônico é selecionado de um lipídeo de Fórmula X. Em uma modalidade, o lipídeo catiônico é selecionado da lista de E0001 a E0171 (E0001-E0171) e E0175 a E0180 (E0175-E0180).

[000339] O(s) outro(s) componente(s) de lipídeo pode(m), por exemplo, ser (a) lipídeos neutro(s). O(s) lipídeo(s) neutro(s) podem, em uma modalidade, ser um ou mais selecionados de qualquer de uma variedade de lipídeos não carregados neutros ou zwitteriônicos. Exemplos de fosfolipídeos neutros para a presente invenção incluem: 5-heptadecilbenzeno-1,3-diol (resorcinol), hemissuccinato de colesterol (CHEMS), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), distearoilfosfatidilcolina (DSPC), fosfocolina (DOPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), fosfatidilcolina (PLPC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina de ovo (EPC), dilaurilfosfatidilcolina (DLPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), 1-miristoil-2-palmitoilfosfatidilcolina (MPPC), 1-palmitoil-2-miristoilfosfatidilcolina (PMPC), 1,2-diarachidoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DBPC), 1-palmitoil-2-estearoilfosfatidilcolina (PSPC), 1-estearoil-2-palmitoilfosfatidilcolina (SPPC), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DAPC), 1,2-dieicosenoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DEPC), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), lisofosfatidilcolina, dilinoleoilfosfatidilcolina distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), dimiristoil fosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoil fosfatidiletanolamina (DPPE), palmitoiloleoil fosfatidiletanolamina (POPE), lisofosfatidiletanolamina ou uma combinação dos mesmos. Em uma modalidade, os fosfolipídeos neutros é selecionado do grupo que consiste em distearoilfosfatidilcolina (DSPC) e dimiristoil fosfatidiletanolamina (DMPE).

[000340] O(s) outro(s) componente(s) de lipídeo pode(m), por exemplo, ser (a) lipídeo(s) aniônico(s), por exemplo, lipídeos aniônicos capazes de produzir um complexo estável. Exemplos de lipídeos

aniônicos são fosfatidilglicerol, cardiolipina, diacilfosfatidilserina, ácido diacilfosfatídico, N-dodecanoil fosfatidil etanoloamina, N-succinil fosfatidiletanolamina, N-glutaril fosfatidiletanolamina e lisilfosfatidilglicerol.

[000341] Lipídeos neutros e aniônicos adequados também incluem aqueles descritos na US 2009/0048197, parágrafo [0119].

[000342] A quantidade total de lipídeo em uma composição que está sendo administrada é, em uma modalidade, de cerca de 5 a cerca de 30 mg de lipídeo por mg de agente biologicamente ativo (por exemplo, siRNA), em outra modalidade de cerca de 5 a cerca de 25 mg de lipídeo por mg de agente biologicamente ativo (por exemplo, siRNA), em outra modalidade de cerca de 7 a cerca de 25 mg de lipídeo por mg de agente biologicamente ativo (por exemplo, siRNA) e em uma modalidade de cerca de 7 a cerca de 15 mg de lipídeo por mg de agente biologicamente ativo (por exemplo, siRNA).

[000343] Vários métodos para carregar agentes biologicamente ativos em composições de lipídeo, tais como lipossomas e liponanopartículas são disponíveis na técnica, incluindo métodos de carga tanto passivos quanto ativos. Quaisquer deles são contemplados como incluídos no escopo da invenção. O método exato usado pode ser escolhido com base em múltiplos fatores que incluem, porém não estão limitados a, por exemplo, o agente biologicamente ativo a ser carregado, o método de armazenagem a ser usado assim que carregado, o tamanho da partícula resultante, e o regime de dosagem contemplado. Os métodos incluem, por exemplo, mistura mecânica do fármaco e lipídeos no momento em que as lipossomas são formadas ou reconstituídas, dissolvendo todos os componentes em um solvente orgânico e concentrando-os em uma película seca, formando um pH ou gradiente de íon para extrair o agente ativo do interior da lipossoma, criando uma transmembrana potencial, e carga

mediada por ionoforo. Veja, por exemplo, pelo menos examples 68, 69 e 77 abaixo, Publicação PCT No. WO 95/08986, Patente dos Estados Unidos No. 5.837.282, Patente dos Estados Unidos No. 5.837.282, e Patente dos Estados Unidos No. 7.811.602.

[000344] A dose de agente biologicamente ativo administrada dependerá de vários fatores, tais como a identidade do agente biologicamente ativo e o paciente alvo (por exemplo, espécies de animal). A concentração de agente biologicamente ativo será ajustada consequentemente porém, quando siRNA está sendo administrado a um animal, uma concentração de 0,1 mg/ml a 10 mg/ml é típica por dose.

[000345] A quantidade total de siRNA pode ser medida por diversos métodos. Métodos de HPLC incluem permuta de ânion, fase reversa (RP) ou exclusão de tamanho (SEC). Métodos fluorescentes podem também ser usados. Em todos estes métodos as nanopartículas devem ser lisadas para liberar o siRNA da nanopartículas antes de medir o teor total de siRNA.

[000346] Em uma modalidade, a composição compreende um componente de lipídeo catiônico que forma de cerca de 10% a cerca de 80%, de cerca de 20% a cerca de 70% ou de cerca de 30% a cerca de 60% do lipídeo total presente na composição. Estas percentagens são percentagens em mol com relação ao total de moles de componentes de lipídeo na partícula de lipídeo final.

[000347] Em uma modalidade, a composição compreende um componente de lipídeo neutro que forma de cerca de 0% a cerca de 50%, de cerca de 0% a cerca de 30% ou de cerca de 10% a cerca de 20% do lipídeo total presente na composição. Em uma modalidade, o componente de lipídeo neutro de uma composição é Opcional. Em uma modalidade, a composição não tem nenhum componente de lipídeo neutro. Estas percentagens são percentagens em mol com

relação ao total de moles de componentes de lipídeo na partícula de lipídeo final.

[000348] Em uma modalidade, a composição compreende um componente auxiliar de lipídeo que forma de cerca de 5% a cerca de 80%, de cerca de 20% a cerca de 70% ou de cerca de 30% a cerca de 50% do lipídeo total presente na composição. Estas percentagens são percentagens em mol com relação ao total de moles de componentes de lipídeo na partícula de lipídeo final.

[000349] Em uma modalidade, a composição compreende um componente de lipídeo furtivo que forma de cerca de 0% a cerca de 10%, de cerca de 1% a cerca de 6%, ou de cerca de 2% a cerca de 5% do lipídeo total presente na composição. Estas percentagens são percentagens em mol com relação ao total de moles de componentes de lipídeo na partícula de lipídeo final.

[000350] Em uma modalidade, a composição compreende um componente de lipídeo catiônico formando de cerca de 30 a cerca de 60% do lipídeo total presente na formulação, um lipídeo neutro formando de cerca de 0 a cerca de 30% do lipídeo total presente na formulação, um lipídeo auxiliar formando de cerca de 18 a cerca de 46% do lipídeo total presente na formulação e um lipídeo furtivo formando de cerca de 2 a cerca de 4% do lipídeo total presente na formulação. Estas porcentagens são porcentagens em mol com relação ao total de moles de componentes de lipídeo na partícula de lipídeo final.

[000351] Composições lipossômicas da invenção são administradas em quaisquer de várias maneiras, incluindo parenteral, intravenosa, sistêmica, local, oral, intratumoral, intramuscular, subcutânea, intraperitoneal, inalação, ou qualquer tal método de liberação. Em uma modalidade, as composições são administradas parenteralmente, isto é, intra-articularmente, intravenosamente, intraperitonealmente,

subcutaneamente, ou intramuscularmente. Em uma modalidade específica, as composições lipossômicas são administradas por infusão intravenosa ou intraperitonealmente por uma injeção em bolo.

[000352] Composições lipossômicas da invenção podem ser formuladas como composições farmacêuticas adequadas para liberação para um indivíduo. As composições farmacêuticas da invenção frequentemente também compreenderão um ou mais tampões (por exemplo, salina tamponada neutra ou salina tamponada de fosfato), carboidratos (por exemplo, glicose, manose, sacarose, dextrose ou dextranos), manitol, proteínas, polipeptídeos ou aminoácidos tais como glicina, antioxidantes, bacteriostatos, agentes quelantes tais como EDTA ou glutathione, adjuvantes (por exemplo, hidróxido de alumínio), solutos que tornam a formulação isotônica, hipotônica ou fracamente hipertônica com o sangue de um recipiente, agentes de suspensão, agentes espessantes e/ou preservativos. Alternativamente, as composições da presente invenção podem ser formuladas como um liofilizado.

[000353] Formulações adequadas para uso na presente invenção podem ser encontradas, por exemplo, em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th Ed. (1985). Frequentemente, composições intravenosas compreenderão uma solução das lipossomas suspensas em um veículo aceitável, tal como um veículo aquoso.

Método para liberação de agentes biologicamente ativos e usos relacionados

[000354] Os lipídeos catiônicos e furtivos da invenção são úteis para formulações usadas para liberação de agentes biologicamente ativos. Formulações contendo os novos lipídeos da invenção podem ser em várias formas, incluindo, porém não limitadas à partícula formando agentes de liberação incluindo micropartículas, nanopartículas e

agentes de transfecção que são úteis para liberação de várias moléculas às células. Formulações específicas são eficazes na transfecção ou liberação de agentes biologicamente ativos, tais como anticorpos (por exemplo, monoclonais, quiméricos, humanizados, nanocorpos, e fragmentos dos mesmos etc.), colesterol, hormônios, peptídeos, proteínas, quimioterápicos e outros tipos de agentes antineoplásicos, fármacos de baixo peso molecular, vitaminas, cofatores, nucleosídeos, nucleotídeos, oligonucleotídeos, ácidos nucleicos enzimáticos, ácidos nucleicos anti-senso, oligonucleotídeos de formação triplex, composições de DNA ou RNA anti-senso, composições de DNA:RNA quiméricas, alozimas, aptâmeros, ribozima, iscas e análogos dos mesmos, plasmídeos e outros tipos de vetores de expressão, e moléculas de ácido nucleico pequenas, agentes de RNAi, ácido nucleico de interferência curto (siNA), RNA de interferência curto (siRNA), RNA de filamento duplo (dsRNA), micro-RNA (miRNA), e moléculas de RNA grampo de cabelo curto (shRNA), às células e/ou tecidos pertinentes, tal como em uma cultura celular, indivíduo ou organismo. A lista acima de agentes biologicamente ativos é apenas exemplar, e não é pretendida ser limitante. Tais compostos podem ser purificados ou parcialmente purificados, e podem ser de ocorrência natural ou sintéticos, e podem ser quimicamente modificados.

[000355] Tais formulações contendo agentes biologicamente ativos são úteis, por exemplo, no fornecimento de composições para prevenir, inibir, ou tratar doenças, condições, ou traços em uma célula, indivíduo ou organismo. As doenças, condições ou traços incluem, porém não estão limitados a, doenças proliferativas, incluindo câncer, doença inflamatória, rejeição de transplante e/ou tecido, doenças ou condições autoimunes, doença relacionada à idade, doença neurológica ou neurodegenerativa, doença respiratória, doença

cardiovascular, doença ocular, doença metabólica, doença dermatológica, doença auditiva, uma doença hepática, uma doença do rim ou renal, etc.

[000356] A quantidade de agente ativo administrada por dose é uma quantidade acima da dose terapêutica mínima porém abaixo de uma dose tóxica. A quantidade real por dose pode ser determinada por um médico dependendo de vários fatores, tais como a história médica do paciente, o uso de outras terapias, o agente biologicamente ativo a ser fornecido, e a natureza da doença. A quantidade de agente biologicamente ativo administrado pode ser ajustada durante todo o tratamento, dependendo da resposta do paciente ao tratamento e a presença ou severidade de quaisquer efeitos colaterais associados ao tratamento. Dosagens exemplares e tratamento para compostos que foram aprovados por uma agência regulatória apropriada são conhecidas e disponíveis para aqueles versados na técnica. Ver, por exemplo, Physician's Desk Reference, 64^a ed., Physician's Desk Reference Inc. (2010), Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa. (1985), e Remington The Science and Practice of Pharmacy, 21^a ed., Lippincott Williams & Williams Publishers (2005).

[000357] Em uma modalidade, uma única dose é administrada de um agente biologicamente ativo a um paciente em necessidade da mesma. Em uma modalidade, múltiplas doses são administradas, em que as múltiplas doses podem ser administradas concomitantemente, sequencialmente ou alternadamente. Em uma modalidade, a mesma formulação é administrada mais de múltiplas doses. Em uma modalidade, as formulações diferem-se mais de múltiplas doses. Em várias modalidades, as doses podem ser administradas uma vez ao dia, ou durante um, dois, três, quatro ou mais dias consecutivos. Em uma modalidade, as doses são administradas uma vez por semana.

Em uma modalidade, as doses são administradas uma vez a cada outra semana. Em uma modalidade, os pacientes recebem pelo menos dois cursos de um regime de tratamento, e potencialmente mais, dependendo da resposta do paciente ao tratamento. Em regimes de agente únicos, os cursos totais de tratamento são determinados pelo paciente e médico com base nas respostas observadas e toxicidade. Os regimes de dosagem acima devem ser considerados como exemplares. Outros regimes de dosagem são contemplados como estando dentro do escopo da invenção, e dependem do efeito terapêutico desejado.

[000358] Em uma modalidade, a invenção fornece um método para liberação de um agente biologicamente ativo a uma célula compreendendo administrar uma composição, que compreende o agente biologicamente ativo e um composto da presente invenção, à célula.

[000359] A célula pode ser *in vitro* ou *in vivo*.

[000360] A invenção fornece um composto de Fórmula (I) para uso em terapia. Ela também fornece subgrupos de compostos de Fórmula I que são também distinguidos nas Fórmulas II a X. Compostos de Fórmulas I a X são geralmente referidos aqui como lipídeos catiônicos.

[000361] A invenção também fornece um composto de Fórmula (XI) para uso em terapia. Ela também fornece um subgrupo de composto de Fórmula XI que é também distinguido na Fórmula XII. Compostos de Fórmulas XI e XII são geralmente referidos aqui como lipídeos furtivos.

[000362] A invenção também fornece um método para o tratamento de uma doença ou condição, compreendendo a etapa de administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição contendo pelo menos um composto de Fórmula (I) a um paciente em combinação com um agente biologicamente ativo que

trata a doença ou condição. A invenção também fornece uma composição contendo pelo menos um composto de Fórmula (XI) para uso no tratamento de uma doença ou condição.

[000363] A invenção também fornece o uso de um composto de Fórmula (I) na fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença ou condição. Em uma modalidade, o medicamento contém um agente biologicamente ativo que trata a doença ou condição. A invenção também fornece o uso de um agente biologicamente ativo que trata uma doença ou condição na fabricação de um medicamento para o tratamento da doença ou condição, em que o medicamento também contém um composto de Fórmula (I) ou Fórmula XI.

[000364] A invenção também fornece um método para o tratamento de uma doença ou condição compreendendo a etapa de administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente biologicamente ativo em uma formulação que contém pelo menos uma composição da invenção a um paciente. Em uma modalidade, a doença ou condição é uma doença do fígado, um tumor ou uma doença. Em uma modalidade, a doença ou condição é tratável administrando um agente de siRNA.

[000365] A invenção também fornece uma composição da invenção para uso tratando uma doença ou condição em um paciente. Em uma modalidade, a doença ou condição é uma doença do fígado, um tumor ou uma doença mediada por uma proteína codificada por um mRNA.

[000366] A invenção também fornece um produto que contém um composto de Fórmula (I) e/ou Fórmula XI. Em uma modalidade, o produto também compreende um agente biologicamente ativo como uma preparação combinada para uso simultâneo, separado ou sequencial em terapia.

Administração & Formulação

Geral

[000367] Para uso farmacêutico, os compostos e composições da invenção podem ser administrados como pelo menos uma porção de um medicamento através de vias enterais ou parenterais, incluindo administração intravenoso, intramuscular, subcutânea, transdérmica, pelas vias aéreas (aerossol), oral, intranasal, retal, vaginal, bucal, nasofaríngea, gastrointestinal ou sublingual. A administração pode ser sistêmica ou tópica. Administração tópica pode envolver, por exemplo, cateterização, implantação, bombeamento osmótico, injeção direta, aplicação dermal/transdérmica, por sonda, gotas otológicas/oculares ou na veia porta. Os compostos de Fórmula (I) e/ou Fórmula XI devem ser avaliados em suas propriedades biofarmacêuticas, tais como solubilidade e estabilidade de solução (através de pH), permeabilidade, etc., a fim de selecionar a forma de dosagem mais apropriada e via de administração para tratamento da indicação proposta.

[000368] Os compostos e composições da invenção geralmente, mas não necessariamente, são administrados como uma formulação em associação com um ou mais excipientes farmacêuticamente aceitáveis. O termo “excipiente” inclui qualquer ingrediente diferente(s) do(s) composto(s) da invenção, o(s) outro(s) componente(s) de lipídeo e o agente biologicamente ativo. Um excipiente pode conferir ou uma característica funcional (por exemplo, controle da taxa de liberação de fármaco) e/ou uma não funcional (por exemplo, auxiliar ou diluente processamento) às formulações. A escolha do excipiente dependerá em grande parte de fatores tais como o modo particular de administração, o efeito do excipiente sobre a solubilidade e estabilidade, e a natureza da forma de dosagem.

[000369] Excipientes farmacêuticamente aceitáveis típicos incluem:

- diluente, por exemplo, lactose, dextrose, sacarose, manitol, sorbitol, celulosa e/ou glicina;
- lubrificantes, por exemplo, sílica, talco, ácido esteárico,

seu sal de magnésio ou cálcio e/ou polietilenoglicol;

- aglutinantes, por exemplo, silicato de alumínio de magnésio, pasta de amido, gelatina, tragacanto, metilcelulose, carboximetilcelulose de sódio e/ou polivinilpirrolidona;

- disintegrantes, por exemplo, amidos, ágar, ácido algínico ou seu sal de sódio, ou misturas efervescentes; e/ou

- absorventes, colorantes, aromatizantes e/ou adoçantes.

[000370] O excipiente pode ser um veículo de solução aquosa que pode opcionalmente conter um tampão (por exemplo, um tampão de PBS) e/ou um açúcar.

[000371] Uma discussão completa de excipientes farmacologicamente aceitável está disponível em Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy 2000, 20ª edição (ISBN: 0683306472).

Administração oral

[000372] Os compostos e composições da invenção podem ser administrados oralmente. A administração oral pode envolver deglutição, de forma que o composto entre no trato gastrointestinal, e/ou administração bucal, lingual, ou sublingual pela qual o composto entra na corrente sanguínea diretamente pela boca.

Administração parenteral

[000373] Os compostos e composições da invenção podem ser administrados parenteralmente. Os compostos e composições da invenção podem ser administrados diretamente na corrente sanguínea, no tecido subcutâneo, no músculo, ou em um órgão interno. Meios adequados para administração incluem intravenosa, intraarterial, intratecal, intraventricular, intrauretral, intrasternal, intracranial, intramuscular, intrassinovial e subcutânea. Dispositivos adequados para administração incluem agulha (incluindo microagulha) injetores, injetores de agulha livre e técnicas de infusão.

[000374] Formulações parenterais são soluções tipicamente aquosas

ou oleosas. Onde a solução é aquosa, excipientes tais como açúcares (incluindo mas restrito a glicose, manitol, sorbitol, etc.), sais, carboidrato e agentes de proteção (de preferência para um pH de 3 a 9), mas, para algumas aplicações, eles podem ser formulados mais adequadamente como uma solução não aquosa estéril ou como uma forma seca para ser usada juntamente com um veículo adequado tal como água sem pirogênio, estéril (WFI).

[000375] Formulações parenterais podem incluir implantes derivados de polímeros degradantes tais como poliésteres (isto é ácido polilático, polilactídeo, polilactídeo-co-glicolídeo, policaprolactona, poli-hidroxibutirato), poliortoésteres e polianidridos. Estas formulações podem ser administradas por incisão cirúrgica no tecido subcutâneo, tecido muscular ou diretamente nos órgãos específicos.

[000376] A preparação de formulações parenterais sob condições estéreis, por exemplo, através de liofilização, pode facilmente ser realizada usando técnicas farmacêuticas padrões bem conhecidas pela pessoa versada.

[000377] A solubilidade dos compostos e composições usados na preparação de soluções parenterais pode ser aumentada pelo uso de técnicas de formulação adequadas, tal como a incorporação de co-solventes e/ou agentes de realce de solubilidade tais como tensoativos, estruturas de micela e ciclodextrinas.

Administração por inalação & intranasal

[000378] Os compostos e composições da invenção podem ser administrados intranasalmente ou por inalação, tipicamente na forma de um pó seco (ou sozinho, como uma mistura, por exemplo, em uma mistura seca com lactose, ou como uma partícula de componente misturado, por exemplo, misturado com fosfolipídeos, tal como fosfatidilcolina) a partir de um inalador de pó seco, como um *spray* de aerossol de um recipiente pressurizado, bomba, *spray*, atomizador (de

preferência um atomizador usando electrohidrodinâmicos para produzir uma névoa boa), ou nebulizador, com ou sem o uso de um propulsor adequado, tal como 1,1,1,2 tetrafluoroetano ou 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano, ou como gotas nasais. Para uso intranasal, o pó pode compreender um agente bioadesivo, por exemplo, quitosana ou ciclodextrina.

[000379] O recipiente pressurizado, bomba, spray, atomizador, ou nebulizador contém uma solução ou suspensão do composto(s) da invenção compreendendo, por exemplo, etanol, etanol aquoso, ou um agente alternativo adequado para dispersar, solubilizar, ou estender a liberação das composições da invenção, um(uns) propelente(s) como solvente e um tensoativo opcional, tal como trioleato de sorbitano, ácido oleico, ou um ácido oligolático.

[000380] Antes de uso em um pó seco ou formulação de suspensão, o composto ou composição é micronizado para um tamanho adequado para liberação através de inalação (tipicamente menos de 5 microns). Isto pode ser obtido por qualquer método de fragmentação adequado, tal como moagem a jato em espiral, moagem a jato de leito fluido, processamento líquido supercrítico para formar nanopartículas, homogeneização de alta pressão, ou secagem por *spray*.

[000381] Cápsulas (feitas, por exemplo, de gelatina ou hidroxipropil-metilcelulose), bolhas e cartuchos para uso em um inalador ou insuflador pode ser formulada para conter uma mistura de pó do composto ou composição da invenção, uma base de pó adequada tal como lactose ou amido e um modificador de desempenho tal como *L*-leucina, manitol, ou estearato de magnésio. A lactose pode ser anidrosa ou na forma do monohidrato, de preferência a última. Outros excipientes adequados incluem dextrana, glicose, maltose, sorbitol, xilitol, frutose, sacarose e trealose.

[000382] Formulações para administração inalada/intranasal podem

ser formuladas para serem de liberação imediata e/ou modificada usando-se, por exemplo, PGLA. Formulações de liberação modificada incluem liberação retardada, prolongada, pulsada, controlada, alvejada e programada.

Administração transdermal

[000383] Formulações adequadas para aplicação transdérmica incluem uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto ou composição da invenção com veículo. Veículos vantajosos incluem solventes farmacologicamente aceitáveis absorvíveis para ajudar passagem pela pele do hospedeiro. Caracteristicamente, dispositivos transdérmicos estão na forma de uma bandagem compreendendo um membro de apoio, um reservatório contendo o composto opcionalmente com veículos, opcionalmente uma barreira de controle de taxa para liberar o composto da pele do hospedeiro a uma taxa controlada e predeterminada sobre um período prolongado de tempo, e meios para prender o dispositivo à pele.

Celas e órgãos alvejados pela invenção

[000384] Os compostos, composições, métodos e usos da invenção podem ser usados para liberar um agente biologicamente ativo para um ou mais do seguinte em um paciente:

- o fígado ou células do fígado (por exemplo, hepatócitos);
- um rim ou células do rim;
- um tumor ou células de tumor;
- o CNS ou células de CNS (Sistema Nervoso Central, por exemplo, cérebro e/ou espinha dorsal);
- o PNS ou células de PNS (Sistema Nervoso Periférico);
- um pulmão ou células pulmonares;
- a vasculatura ou células vasculares;
- a pele ou células da pele (por exemplo, células da derme e/ou células foliiculares);

um olho ou células oculares (por exemplo, mácula, fóvea, córnea, retina), e

um ouvido ou células do ouvido (por exemplo, células do ouvido interno, do ouvido médio e/ou ouvido exterior).

[000385] Em uma modalidade, os compostos, composições, métodos e usos da invenção são para a liberação de um agente biologicamente ativo para células do fígado (por exemplo, hepatócitos). Em uma modalidade, os compostos, composições, métodos e usos da invenção são para liberação de um agente biologicamente ativo para um tumor ou para células de tumor (por exemplo, um tumor primário ou células de câncer metastático).

[000386] Para liberação de um agente biologicamente ativo para o fígado ou células do fígado, em uma modalidade um composto ou composição da invenção é contatado com o fígado ou células do fígado do paciente como é geralmente conhecido na técnica, tal como por meio de administração parental (por exemplo, administração intravenosa, intramuscular, subcutânea) ou administração local (por exemplo, injeção direta, injeção de veia portal, cateterização, sondagem), para facilitar liberação.

[000387] Para liberação de um agente biologicamente ativo para o rim ou células de rim, em uma modalidade um composto ou composição da invenção é contatado com o rim ou células do rim do paciente como é geralmente conhecido na técnica, tal como por meio de administração parental (por exemplo, administração intravenosa, intramuscular, subcutânea) ou administração local (por exemplo, injeção direta, cateterização, sondagem), para facilitar liberação.

[000388] Para liberação de um agente biologicamente ativo para um tumor ou células de tumor, em uma modalidade um composto ou composição da invenção é contatado com o tumor ou células de tumor do paciente como é geralmente conhecido na técnica, tal como por

meio de administração parental (por exemplo, administração intravenosa, intramuscular, subcutânea) ou administração local (por exemplo, injeção direta, cateterização, sondagem), para facilitar liberação.

[000389] Para liberação de um agente biologicamente ativo para o CNS ou células de CNS (por exemplo, sondagem), em uma modalidade um composto ou composição da invenção é contatado com o CNS ou células de CNS (por exemplo, células cerebrais e/ou células da espinha dorsal) do paciente como é geralmente conhecido na técnica, tal como por meio de administração parental (por exemplo, administração intravenosa, intramuscular, subcutânea) ou administração local (por exemplo, injeção direta, cateterização, sondagem, administração de bomba osmótica (por exemplo, intratecal ou ventricular)), para facilitar liberação.

[000390] Para liberação de um agente biologicamente ativo para o PNS ou células de PNS, em uma modalidade um composto ou composição da invenção é contatado com o PNS ou células de PNS do paciente como é geralmente conhecido na técnica, tal como por meio de administração parental (por exemplo, administração intravenosa, intramuscular, subcutânea) ou administração local (por exemplo, injeção direta), para facilitar liberação.

[000391] Para liberação de um agente biologicamente ativo para um pulmão ou células pulmonares, em uma modalidade um composto ou composição da invenção é contatado com o pulmão ou células pulmonares do paciente como é geralmente conhecido na técnica, tal como por meio de administração parental (por exemplo, administração intravenosa, intramuscular, subcutânea) ou administração local (por exemplo, administração pulmonar diretamente para tecidos pulmonares e células), para facilitar liberação.

[000392] Para liberação de um agente biologicamente ativo para a

vasculatura ou células vasculares, em uma modalidade um composto ou composição da invenção é contatado com a vasculatura ou células vasculares do paciente como é geralmente conhecido na técnica, tal como por meio de administração parental (por exemplo, administração intravenosa, intramuscular, subcutânea) ou administração local (por exemplo, clapeamento, cateterização, sondagem), para facilitar liberação.

[000393] Para liberação de um agente biologicamente ativo para a pele ou células de pele (por exemplo, células da derme e/ou células foliculares), em uma modalidade um composto ou composição da invenção é contatado com a pele ou células de pele (por exemplo, células da derme e/ou células foliculares) do paciente como é geralmente conhecido na técnica, tal como por meio de administração parental (por exemplo, administração intravenosa, intramuscular, subcutânea) ou administração local (por exemplo, aplicação dérmica direta, iontoforese), para facilitar liberação.

[000394] Para liberação de um agente biologicamente ativo para um olho ou células oculares (por exemplo, mácula, fóvea, córnea, retina), em uma modalidade um composto ou composição da invenção é contatado com o olho ou células oculares (por exemplo, mácula, fóvea, córnea, retina) do paciente como é geralmente conhecido na técnica, tal como por meio de administração parental (por exemplo, administração intravenosa, intramuscular, subcutânea) ou administração local (por exemplo, injeção direta, injeção intraocular, injeção periocular, iontoforese, uso de colírio, implantes), para facilitar liberação.

[000395] Para liberação de um agente biologicamente ativo para um ouvido ou células do ouvido (por exemplo, células do ouvido interno, ouvido médio e/ou ouvido exterior), em uma modalidade um composto ou composição da invenção é contatado com o ouvido ou células do ouvido (por exemplo, células do ouvido interno, ouvido médio e/ou

ouvido exterior) do paciente como é geralmente conhecido na técnica, tal como por meio de administração parental (por exemplo, administração intravenosa, intramuscular, subcutânea) ou administração local (por exemplo, injeção direta), para facilitar liberação.

Tratamento de doenças ou condições

[000396] As doenças ou condições que podem ser tratadas por esta invenção incluem aquelas relacionadas para modulação em um paciente de um gene, expressão de gene, proteína, atividade de proteína, série de reações celulares, e outros mais. A doença ou condição tratada por esta invenção pode ser uma ou mais selecionada do grupo que consiste em: uma doença proliferativa (por exemplo, um tumor); uma doença inflamatória; transplante e/ou rejeição do tecido (rejeição de aloenxerto); uma doença autoimune; uma doença infecciosa; uma doença relacionada a idade; uma doença neurológica ou neurodegenerativa (por exemplo, doença de Huntington); uma doença metabólica; uma doença cardiovascular; uma doença respiratória; uma doença ocular; uma doença dermatológica; uma doença audível (por exemplo, perda de audição, surdez); uma doença do fígado (por exemplo, hepatite, HCV, HBV, diabetes, cirrose, carcinoma hepatocelular), e uma doença do fígado/rim (por exemplo, doença de rim policístico). Em uma modalidade particular, a invenção trata uma doença proliferativa, por exemplo, um tumor ou célula de tumor. Em uma modalidade particular, a invenção trata uma doença do fígado, por exemplo, hepatite, HCV, HBV, diabetes, cirrose e certos carcinomas hepatocelulares.

[000397] A pessoa versada será capaz de selecionar um agente biologicamente ativo que em combinação com um composto da presente invenção libera uma quantidade terapêuticamente eficaz do agente. Onde o agente é um RNAi terapêutico, o efeito terapêutico desejado é modulação da expressão de um gene-alvo designado na

doença ou condição de interesse. Em uma modalidade, a redução de expressão gênica e, por conseguinte, redução no nível da respectiva proteína/RNA alivia, de alguma forma, os sintomas da doença ou condição.

Eficácia

[000398] Os compostos, composições, métodos e usos podem envolver condições de administração adequado para reduzir ou inibir, ou melhorar uma doença ou distúrbio. Em uma modalidade, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de RNAi é administrada a um paciente com necessidade do mesmo, em que o nível de expressão do gene-alvo é reduzido no paciente comparado a um paciente não tratado.

[000399] Em uma modalidade, a expressão de um gene-alvo implicada na doença ou condição de interesse é reduzida em aproximadamente 10%, mais preferivelmente cerca de 20%, mais preferivelmente cerca de 30%, mais preferivelmente cerca de 40%, mais preferivelmente cerca de 50%, mais preferivelmente cerca de 60%, mais preferivelmente cerca de 70%, mais preferivelmente cerca de 80%, mais preferivelmente cerca de 90%, mais preferivelmente cerca de 95%, mais preferivelmente cerca de 98%, e de preferência cerca de 100% relativo a um paciente não tratado.

Definições

[000400] Como usado ao longo desta descrição, artigos tais como “um” e “uma” se referem a um ou mais que um (pelo menos um) do objeto gramatical do artigo.

Compostos de Fórmulas (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (X), (XI) e (XII) e derivados dos mesmos

[000401] Como usado aqui, as expressões “(lipídeo) composto da invenção”, “(lipídeo) composto de Fórmula (I)”, “(lipídeo) composto”, “lipídeo catiônico” etc. (isto é todas as referências para os lipídeos

catiônicos da invenção, e/ou “lipídeos furtivos” incluem derivados farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos e polimorfos, isômeros e variantes rotulados isotopicamente dos mesmos. Além disso, as referidas expressões incluem compostos de Fórmula (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX) e (X) para lipídeos catiônicos; e Fórmulas (XI) e (XII) para lipídeos furtivos; e modalidades dos mesmos descritas aqui.

Derivados farmaceuticamente aceitáveis

[000402] A expressão “derivado farmaceuticamente aceitável” inclui qualquer sal, solvato ou hidrato farmaceuticamente aceitável de um composto de Fórmula (I). Em uma modalidade, os derivados farmaceuticamente aceitáveis são sais, solvatos ou hidratos farmaceuticamente aceitáveis de um composto de Fórmula (I).

Sais farmaceuticamente aceitáveis

[000403] A expressão “sal farmaceuticamente aceitável” inclui um sal preparado de ácidos ou bases não tóxicos farmaceuticamente aceitáveis incluindo ácidos e bases inorgânicos ou orgânicos. Para uma revisão de sais farmaceuticamente aceitáveis, veja Stahl e Wermuth, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use (Wiley VCH, Weinheim, Alemanha, 2002).

Solvatos & hidratos

[000404] Os compostos da invenção podem existir em ambas as formas não solvatadas e solvatadas. O termo “solvato” inclui complexos moleculares compreendendo um composto da invenção e uma ou mais moléculas de solvente farmaceuticamente aceitável tais como água ou C₁₋₆ álcoois, por exemplo, etanol. O termo “hidrato” significa um “solvato” onde o solvente é água.

Formas isoméricas

[000405] Compostos da invenção podem existir em uma ou mais formas geométricas, ópticas, enantioméricas, diastereoméricas e tautoméricas, incluindo mas não limitadas as formas cis e trans,

formas E e Z, formas R, S e meso, formas ceto e enol. Todas as tais formas isoméricas são incluídas dentro da invenção. As formas isoméricas podem estar em formas isomericamente puras ou enriquecidas, assim como em misturas de isômeros (por exemplo, misturas racêmicas ou diastereoméricas).

[000406] Por conseguinte, a invenção fornece pelo menos, por exemplo:

- misturas estereoisoméricas de compostos de Fórmula (I);
- um isômero diastereomericamente enriquecido ou diastereomericamente puro de um composto de Fórmula (I); ou
- um isômero enantiomericamente enriquecido ou enantiomericamente puro de um composto de Fórmula (I).

[000407] Onde isômeros adequados podem ser separados de suas misturas pela aplicação ou adaptação de métodos conhecidos (por exemplo, técnicas cromatográficas e técnicas de recristalização). Onde isômeros adequados podem ser preparados pela aplicação ou adaptação de métodos conhecidos (por exemplo, síntese assimétrica).

Rotulagem isotópica

[000408] A invenção inclui compostos isotopicamente rotulados farmaceuticamente aceitáveis de Fórmula (I) em que um ou mais átomos são substituídos por átomos que têm o mesmo número atômico, mas uma massa atômica ou número de massa diferente da massa atômica ou número de massa normalmente encontrado na natureza.

[000409] Exemplos de isótopos adequados para inclusão nos compostos da invenção incluem isótopos de hidrogênio, tais como ^2H e ^3H , carbono, tais como ^{11}C , ^{13}C e ^{14}C , cloro, tais como ^{36}Cl , flúor, tais como ^{18}F , iodo, tais como ^{123}I e ^{125}I , nitrogênio, tais como ^{13}N e ^{15}N , oxigênio, tais como ^{15}O , ^{17}O e ^{18}O , fósforo, tais como ^{32}P , e enxofre, tal como ^{35}S . Certo compostos isotopicamente rotulados de Fórmula (I),

por exemplo, aqueles incorporando um isótopo radioativo, são úteis em estudos de distribuição de tecido de fármaco e/ou substrato. Os isótopos radioativos ^3H e ^{14}C são particularmente úteis para este propósito devido à sua facilidade de incorporação e meios disponíveis de detecção.

[000410] Substituição com pósitron emitindo isótopos, tais como ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O e ^{13}N , podem ser úteis em estudos de Topografia por Emissão de Pósitron (PET).

[000411] Compostos isotopicamente rotulados de Fórmula (I) geralmente podem ser preparados por técnicas convencionais conhecidas pela pessoa versada ou por processos análogos àqueles descritos aqui usando um reagente isotopicamente rotulado adequado em vez do reagente não rotulado usado.

Definições terapêuticas

[000412] Tal como usado aqui, “tratamento” inclui tratamento melhorado, curativo e profilático. Tal como usado aqui, um “paciente” significa um animal, de preferência um mamífero, de preferência um humano, com necessidade de tratamento.

[000413] O “agente biologicamente ativo” é de preferência um composto terapêutico, isto é um composto que é útil para o tratamento ou prevenção de uma doença ou uma condição.

[000414] O agente biologicamente ativo inclui mas não está limitado a, por exemplo, anticorpos, colesterol, hormônios, antivirais, peptídeos, polipeptídeos, proteínas, nucleoproteínas, quimioterapêuticos, fármacos de peso molecular baixo, vitaminas, cofatores, nucleosídeos, derivados de nucleosídeo, nucleotídeos, oligonucleotídeos, ácidos nucleicos enzimáticos, ácidos nucleico anti-senso, oligonucleotídeos de formação triplex, quimeras anti-senso 2,5-A, alozimas, aptâmeros, ribozima, moléculas de RNA iscas e análogos dos mesmos, e moléculas de ácido nucleico pequenas, tal como um inibidor de RNA

(RNAi) incluindo, por exemplo, ácido nucleico de interferência curto (siNA), RNA de interferência curto (siRNA), RNA de filamento duplo (dsRNA), micro RNA (miRNA), e RNA grampo de cabelo curto (shRNA). Em uma modalidade o agente biologicamente ativo é de preferência um nucleosídeo ou derivado de nucleosídeo, por exemplo, um ácido nucleico, um oligonucleotídeo, um polinucleotídeo (por exemplo, siNA, miRNA, RNAi, anti-senso, aptâmero, ribozima, isca, ribozima, 2-5A, oligonucleotídeo de formação triplex), e de preferência um siRNA, miRNA, inibidor de siRNA ou uma inibidor de miRNA.

[000415] Em uma modalidade, o agente biologicamente ativo é uma molécula de siNA (ácido nucleico de interferência curto). Em uma modalidade, o siNA é siDNA. Em uma modalidade, o siNA é siRNA. Em uma modalidade, o siNA é miRNA.

[000416] Em uma modalidade, o agente biologicamente ativo é uma molécula de ácido nucleico pequena, referida abaixo com propósitos de conveniência apenas como uma molécula de “siNA”, expressão regulada abaixo de um gene-alvo, por exemplo, em que o gene-alvo compreende uma sequência codificadora alvo ou em que o gene-alvo compreende uma sequência não codificadora alvo ou elementos reguladores envolvido na expressão gênica alvo.

[000417] O siNA pode ser filamento único, duplo, ou múltiplo. Em uma modalidade, é filamento duplo.

[000418] Em uma modalidade, o siNA compreende nucleotídeos não modificados e/ou não nucleotídeos. Em uma modalidade, o siNA compreende pelo menos um, ou mais que um, nucleotídeos modificados e/ou não nucleotídeos. Em uma modalidade, o nucleotídeo modificado compreende uma porção básica modificada. Em uma modalidade, o nucleotídeo modificado compreende uma porção de açúcar modificada. Em uma modalidade, o nucleotídeo modificado compreende uma porção de esqueleto modificada. Em

uma modalidade, o siNA compreende um ou mais de uma porção de base modificada, uma porção de açúcar modificada, e/ou uma porção de esqueleto modificada.

[000419] Em uma modalidade, a molécula de siNA compreende cerca de 15 a cerca de 40 (por exemplo, cerca de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 23, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, ou 40) pares básicos, em uma sub-modalidade cerca de 15 para a cerca de 30 (por exemplo, cerca de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ou 30) pares básicos, em uma sub-modalidade cerca de 15 a cerca de 28 pares básicos, em uma sub-modalidade cerca de 17 a cerca de 25 pares básicos, em uma sub-modalidade cerca de 18 a cerca de 23 pares básicos, em uma sub-modalidade adicional cerca de 19 a cerca de 22 pares básicos. Em uma modalidade o siNA compreende cerca de 17 pares básicos. Em uma modalidade o siNA compreende cerca de 18 pares básicos. Em uma modalidade o siNA compreende cerca de 19 pares básicos. Em uma modalidade o siNA compreende cerca de 20 pares básicos. Em uma modalidade o siNA compreende cerca de 21 pares básicos.

[000420] Em uma modalidade, cada um dos dois esqueletos da molécula de siNA independentemente compreende cerca de 15 a cerca de 40 (por exemplo, cerca de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 23, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, ou 40) nucleotídeos, em uma sub-modalidade cerca de 15 a cerca de 30 (por exemplo, cerca de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ou 30) nucleotídeos, em uma sub-modalidade cerca de 15 a cerca de 28 nucleotídeos, em uma sub-modalidade cerca de 17 a cerca de 25 nucleotídeos, em uma sub-modalidade cerca de 18 a cerca de 23 nucleotídeos, em uma sub-modalidade adicional cerca de 19 a cerca de 22 nucleotídeos. Em uma modalidade cada esqueleto é cerca de 17 nucleotídeos de comprimento. Em uma modalidade cada esqueleto é

cerca de 18 nucleotídeos de comprimento. Em uma modalidade cada esqueleto é cerca de 19 nucleotídeos de comprimento. Em uma modalidade cada esqueleto é cerca de 20 nucleotídeos de comprimento. Em uma modalidade cada esqueleto é cerca de 21 nucleotídeos.

[000421] Em uma modalidade, a molécula de siNA direciona a clivagem de um RNA alvo por meio de um complexo de RISC, isto é, Interferência de RNA (RNAi).

[000422] Em uma modalidade, a molécula de siNA compreende um primeiro e um segundo esqueleto, o primeiro esqueleto do siNA compreende uma sequência de nucleotídeos tendo complementaridade suficiente para o RNA alvo para a molécula de siNA direcionar a clivagem do RNA alvo por meio de interferência de RNA, e o segundo esqueleto da referida molécula de siNA compreende uma sequência de nucleotídeos que é complementar ao primeiro esqueleto.

[000423] Em uma modalidade, a molécula de ácido nucleico de interferência curto (siNA) é uma molécula de duplo esqueleto sintetizada quimicamente.

[000424] Em uma modalidade, o siNA inibe a expressão dos genes alvos ou uma família de gene-alvo, em que os genes ou as sequências de família de gene compartilham a homologia da sequência. Tais sequências homólogas podem ser identificadas como são conhecidas na técnica, por exemplo, usando alinhamentos de sequência. Tais moléculas de siNA podem ser projetadas para alvejar tais sequências homólogas, por exemplo, usando sequências perfeitamente complementares ou por incorporação de pares básicos não canônicos, por exemplo, pareamentos incorretos e/ou pares básicos instáveis que podem fornecer sequências alvos adicionais.

[000425] Em uma modalidade, a molécula de siNA de filamento duplo não contém nenhum ribonucleotídeos. Em outra modalidade, a

molécula de siNA de filamento duplo compreende um ou mais ribonucleotídeos.

[000426] Em uma modalidade, a molécula de siNA que sub-regula a expressão de um gene-alvo compreende uma região anti-senso, em que a região anti-senso compreende uma sequência de nucleotídeos que é complementar para uma sequência de nucleotídeos do gene-alvo ou uma porção do mesmo, e uma região de senso, em que a região de senso compreende uma sequência de nucleotídeos substancialmente similar à sequência de nucleotídeos do gene-alvo ou uma porção do mesmo. Em uma modalidade, a região anti-senso e a região de senso independentemente compreende cerca de 15 a cerca de 30 (por exemplo, cerca de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ou 30) nucleotídeos. Em uma modalidade, a região anti-senso compreende uma sequência de nucleotídeos que é complementar a uma sequência de nucleotídeos de RNA codificado pelo gene-alvo ou uma porção do mesmo, e a região de senso compreende uma sequência de nucleotídeos que é complementar à região anti-senso.

[000427] Em uma modalidade, a molécula de siNA compreende uma extremidade embotada. Em uma modalidade, a molécula de siNA compreende duas extremidades embotadas, isto é, um terminal simétrico sem quaisquer nucleotídeos não emparelhados pendentes.

[000428] Em uma modalidade, todos os nucleotídeos de cada fragmento da molécula de siNA são emparelhados por base a nucleotídeos complementares sobre o outro filamento da molécula de siNA.

[000429] Em uma modalidade, a molécula de siNA compreende um ou mais dos seguintes aspectos: um pareamento errôneo, uma protuberância, uma alça e um par de base oscilante, cada dos quais pode modular a atividade da molécula de siNA para mediar a interferência de RNA.

[000430] Em uma modalidade, a região de senso é conectada à região anti-senso por meio de uma molécula ligadora, tal como um ligante de polinucleotídeo ou um ligante de não nucleotídeo.

[000431] Em uma modalidade, a molécula de siNA tem um ou mais nucleotídeos de pirimidina e/ou purina modificados. Em uma modalidade, os nucleotídeos de pirimidina na região de senso são nucleotídeos de 2'-O-metilpirimidina ou nucleotídeos de 2'-deóxi-2'-flúor pirimidina e os nucleotídeos de purina presentes na região de senso são nucleotídeos de 2'-deóxi purina. Em outra modalidade, os nucleotídeos de pirimidina na região de senso são nucleotídeos de 2'-deóxi-2'-flúor pirimidina e os nucleotídeos de purina presentes na região de senso são nucleotídeos de 2'-O-metil purina. Em outra modalidade, os nucleotídeos de pirimidina na região de senso são nucleotídeos de 2'-deóxi-2'-flúor pirimidina e os nucleotídeos de purina presentes na região de senso são nucleotídeos de 2'-deóxi purina. Em uma modalidade, os nucleotídeos de pirimidina na região anti-senso são nucleotídeos de 2'-deóxi-2'-flúor pirimidina e os nucleotídeos de purina presentes na região anti-senso são nucleotídeos de 2'-O-metil ou 2'-deóxi purina.

[000432] Em uma modalidade, o filamento de senso tem uma região não complementar. Opcionalmente, os nucleotídeos presentes na referida região não complementar são todos 2'-deóxi nucleotídeos.

[000433] Em uma modalidade, o polinucleotídeo compreendendo a região de senso inclui uma porção de remate terminal na extremidade 5', na extremidade 3', ou ambas as extremidades 5' e 3' do filamento. Em uma modalidade, o polinucleotídeo compreendendo o filamento anti-senso inclui uma porção de remate terminal na extremidade 5', na extremidade 3', ou ambas as extremidades 5' e 3' do filamento. Em uma modalidade, a porção de remate terminal é uma porção abásica deóxi invertida ou porção glicerila. Outros exemplos de porções de

remate terminais são conhecidos na técnica, por exemplo, WO 2005/021749 e WO 2007/128477.

[000434] Em uma modalidade, o siNA tem ligações de fosfito, fosfodiéster, fosforotioato e/ou fosforoditioato na cadeia principal de polinucleotídeo. Em uma modalidade, o siNA tem pelo menos uma ligação de fosforotioato. Em uma modalidade, o siNA tem pelo menos uma ligação de fosforoditioato.

[000435] Em uma modalidade, as modificação(ões) de nucleotídeo estão presentes em localizações especificamente selecionadas no siNA que são sensíveis à clivagem por ribonucleases, tais como localizações tendo nucleotídeos de pirimidina.

[000436] Em uma modalidade, cada dos dois nucleotídeos de terminal 3' de cada filamento da molécula de siNA é um nucleotídeo de 2'-deóxi-pirimidina, tal como um 2'-deóxi-timidina.

[000437] A quantidade do composto da invenção e o agente biologicamente ativo (por exemplo, o composto terapêutico) administrada deve ser uma quantidade terapeuticamente eficaz onde usada para o tratamento de uma doença ou condição, e uma quantidade profilaticamente eficaz onde usada para a prevenção de uma doença ou condição.

[000438] O termo “quantidade terapeuticamente eficaz” se refere à quantidade do composto da invenção e do agente biologicamente ativo (por exemplo, o composto terapêutico) necessária para tratar ou melhorar uma doença ou condição alvejada. O termo “quantidade profilaticamente eficaz” usado aqui se refere à quantidade do composto da invenção e do agente biologicamente ativo (por exemplo, o composto terapêutico) necessária para prevenir uma doença ou condição alvejada. A dosagem exata geralmente será dependente do estado do paciente no momento de administração. Fatores que podem ser levados em consideração quando determinando a dosagem

incluem a severidade do estado da doença no paciente, a saúde geral do paciente, a idade, peso, gênero, dieta, tempo, frequência e via de administração, identidade do agente biologicamente ativo (por exemplo, o composto terapêutico), sensibilidades de reação e a tolerância do paciente ou resposta à terapia. A quantidade precisa pode ser determinada por experimentação de via, porém pode finalmente encontrar-se com o diagnóstico do clínico. Geralmente, uma dose eficaz será de 0,01 mg/kg/dia (massa de fármaco comparada à massa do paciente) a 1000 mg/kg/dia, *por exemplo*, 1 mg/kg/dia a 100 mg/kg/dia. As composições podem ser administradas individualmente a um paciente ou podem ser administradas em combinação com outros agentes, fármacos ou hormônios.

[000439] Em quaisquer dos métodos de tratamento ou usos associados, o composto ou composição da invenção pode ser administrado ao paciente como um curso de tratamento, por exemplo, administração em vários intervalos de tempo, tais como uma vez por dia durante o curso de tratamento, uma vez a cada dois dias durante o curso de tratamento, uma vez a cada três dias durante o curso de tratamento, uma vez a cada quatro dias durante o curso de tratamento, uma vez a cada cinco dias durante o curso de tratamento, uma vez a cada seis dias durante o curso de tratamento, uma vez por semana durante o curso de tratamento, uma vez a cada outra semana durante o curso de tratamento, uma vez por mês durante o curso de tratamento, etc. Em uma modalidade, o curso de tratamento é uma vez a cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 semanas. Em uma modalidade, o curso de tratamento é de cerca de uma a cerca de 52 semanas ou mais (por exemplo, indefinidamente). Em uma modalidade, o curso de tratamento é de cerca de um a cerca de 48 meses ou mais (por exemplo, indefinidamente).

[000440] Em uma modalidade, um curso de tratamento envolve um

curso inicial de tratamento, tal como uma vez a cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais semanas durante um intervalo fixo (por exemplo, 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x ou mais) seguido por um curso de manutenção de tratamento, tal como uma vez a cada 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, ou mais semanas durante um intervalo fixo adicional (por exemplo, 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x ou mais).

[000441] Por “doença proliferativa” como usado aqui se entende qualquer doença, condição, traço, genótipo ou fenótipo caracterizado por replicação ou crescimento celular desregulado como é conhecido na técnica. Em uma modalidade, a doença proliferativa é câncer. Em uma modalidade, a doença proliferativa é um tumor. Em uma modalidade, a doença proliferativa inclui, porém não está limitada a, por exemplo, tumores líquidos tais como, por exemplo, leucemias, por exemplo, leucemia mielógena aguda (AML), leucemia mielógena crônica (CML), leucemia linfocítica aguda (ALL), mieloma múltiplo, e leucemia linfocítica crônica; e tumores sólidos, por exemplo, cânceres relacionados a AIDS tais como sarcoma de Kaposi; cânceres de mama; cânceres ósseos; cânceres cerebrais; cânceres da cabeça e pescoço, linfoma de não Hodgkins, adenoma, carcinoma de célula escamosa, carcinoma laríngeo, cânceres de vesícula biliar e ducto biliar, cânceres da retina, cânceres do esôfago, cânceres gastrointestinais, câncer de ovário, câncer uterino, câncer de tireoide, câncer testicular, câncer endometrial, melanoma, câncer colorretal, câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de próstata, câncer de pulmão (incluindo carcinoma de pulmão de célula não pequena), câncer pancreático, sarcomas, tumor de Wilms, câncer cervical, câncer de cabeça e pescoço, cânceres de pele, carcinoma nasofaríngeo, lipossarcoma, carcinoma epitelial, carcinoma de célula renal, adenocarcinoma de vesícula biliar, sarcoma endometrial, cânceres resistentes a múltiplos fármacos. Em uma modalidade, a

doença proliferativa inclui neovascularização associada com angiogênese de tumor, degeneração macular (por exemplo, degeneração macular relacionada à idade úmida/seca), neovascularização da córnea, retinopatia diabética, glaucoma neovascular, degeneração miópica. Em uma modalidade, a doença proliferativa inclui restenose e doença renal policística.

[000442] Por “doença inflamatória” como usado aqui se entende qualquer doença, condição, traço, genótipo ou fenótipo caracterizado por um processo inflamatório ou alérgico como é conhecido na técnica. Doenças inflamatórias incluem, porém não estão limitadas a, por exemplo, inflamação (por exemplo, inflamação aguda e/ou crônica), doença respiratória, aterosclerose, psoríase, dermatite, restenose, asma, rinite alérgica, dermatite atópica, choque séptico, artrite reumatoide, doença intestinal inflamatória, doença pélvica inflamatória, dor, doença inflamatória ocular, doença celíaca, tuberculose, silicose e outras pneumoconioses.

[000443] Por “doença autoimune” como usado aqui se entende qualquer doença, condição, traço, genótipo ou fenótipo caracterizado por autoimunidade como é conhecido na técnica. Doenças autoimunes incluem, porém não estão limitadas a, por exemplo, esclerose múltipla, diabetes melito, lúpus, esclerodermia, fibromialgia, rejeição de transplante (por exemplo, prevenção de rejeição de aloenxerto), anemia perniciosa, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, dermatomiosite, miastenia grave, lúpus eritematoso, esclerose múltipla, e doença de Grave.

[000444] Por “doença infecciosa” entende-se qualquer doença, distúrbio ou condição associada com um agente infeccioso, tal como um vírus, bactérias, fungo, priônio ou parasita.

[000445] Por “doença neurológica” entende-se qualquer doença, distúrbio, ou condição que afeta o sistema nervoso central ou

periférico. Doenças neurológicas incluem, porém não estão limitadas a, doenças ou distúrbios do sistema nervoso periférico ou central incluindo, por exemplo, doença de Alzheimer, aneurisma, injúria cerebral, síndrome do túnel carpal, aneurisma cerebral, dor crônica, doença de Creutzfeldt-Jakob, epilepsia, doença de Huntington, meningite, distúrbios epilépticos, e outras doenças, distúrbios e síndromes neurológicas.

[000446] Por “doença respiratória” entende-se qualquer doença ou condição que afeta o trato respiratório. Doenças respiratórias incluem, porém não estão limitadas a, por exemplo, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), rinite alérgica, sinusite, alergias, respiração impedida, síndrome da angústia respiratória, fibrose cística, vasoconstricção ou hipertensão pulmonar e enfisema.

[000447] Por “doença cardiovascular” entende-se uma doença ou condição que afeta o coração e vasculatura. Doenças cardiovasculares incluem, porém não estão limitadas a, por exemplo, doença cardíaca coronariana (CHD), doença cerebrovascular (CVD), estenose aórtica, doença vascular periférica, infarto do miocárdio (ataque cardíaco), arritmia, e insuficiência cardíaca congestiva.

[000448] Por “doença ocular” como usado aqui se entende qualquer doença, condição, traço, genótipo ou fenótipo dos olhos e estruturas relacionadas. Doenças oculares incluem, porém não estão limitadas a, por exemplo, edema macular cistoide, retinopatia diabética, degeneração de treliça, oclusão de veia retinal, oclusão de artéria retinal, degeneração macular (por exemplo, degeneração macular relacionada com a idade tal como AMD úmida ou AMD seca), toxoplasmose, retinite pigmentosa, laceração conjuntival, laceração corneal, glaucoma, e similares.

[000449] Por “doença metabólica” entende-se qualquer doença ou condição que afeta trilhas metabólicas. Doença metabólica pode

resultar em um processo metabólico anormal, congênito devido à anormalidade de enzima herdada (erros inatos de metabolismo) ou adquirido devido à doença de um órgão endócrino ou insuficiência de um órgão metabolicamente importante tal como o fígado. Em uma modalidade, doença metabólica inclui obesidade, resistência à insulina, e diabetes (por exemplo, diabetes tipo I e/ou tipo II).

[000450] Por “doença dermatológica” entende-se qualquer doença ou condição da pele, derme, ou qualquer subestrutura desta tal como um cabelo, um folículo, etc. Doenças, distúrbios, condições, e traços dermatológicos podem incluir psoríase, dermatite ectópica, cânceres de pele tais como melanoma e carcinoma de célula basal, perda de cabelo, remoção de cabelo e alterações em pigmentação.

[000451] Por “doença auditiva” entende-se qualquer doença ou condição do sistema auditivo, incluindo o ouvido, tal como o ouvido interno, ouvido médio, ouvido externo, nervo auditivo, e quaisquer subestruturas deste. Doenças, distúrbios, condições, e traços auditivos podem incluir perda de audição, surdez, tinido, vertigem, distúrbios de equilíbrio e movimento.

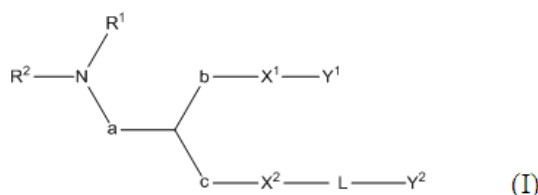
[000452] Em uma modalidade, a doença ou condição é uma doença do fígado, um tumor, uma doença mediada por FVII, e/ou uma doença mediada por PLK1. Doenças mediadas por FVII incluem coagulação do sangue anormal e tumores; tais doenças desse modo incluem trombose (por exemplo, tromboembolismos venosos, embolismos pulmonares e acidentes vasculares cerebrais).

Termos Bioquímicos e Definições

[000453] O termo “lipídio” se refere a um grupo de compostos orgânicos que inclui, porém não está limitado a ésteres de ácidos graxos e são caracterizados sendo insolúveis em água, porém solúveis na maioria dos solventes orgânicos. Os lipídios podem ser divididos em pelo menos três classes (1) “lipídios simples” que incluem

gorduras e óleos bem como ceras; (2) “lipídios compostos” que incluem fosfolipídios e glicolipídios, e (3) “lipídios derivados” tais como esteroides.

[000454] O termo “lipídio catiônico” como usado aqui significa qualquer composto lipofílico tendo uma carga catiônica, tal como um composto tendo Fórmula (I)



[000455] em que as definições são como estabelecido em outra parte aqui. Outros exemplos de lipídios catiônicos são estabelecidos acima sob o título “composições”.

Lipídios Auxiliares

[000456] O termo “lipídio auxiliar” como usado aqui significa um lipídio que realça a transfecção (por exemplo, transfecção da nanopartícula incluindo o agente biologicamente ativo) até certo ponto. O mecanismo pelo qual o lipídio auxiliar realça a transfecção pode incluir, por exemplo, realce da estabilidade de partícula e/ou realce da fusogenicidade de membrana. Lipídios auxiliares incluem esteroides e resorcinóis de alquila. Exemplos de lipídios auxiliares são colesterol, 5-heptadecilresorcinol, e hemissuccinato de colesterol.

Lipídios Furtivos

[000457] O termo “lipídio furtivo” como usado aqui significa um lipídio que aumenta a duração de tempo durante o qual as nanopartículas podem existir *in vivo* (por exemplo, no sangue). Em uma modalidade, um lipídio furtivo compreende um grupo cabeça polímero hidrofílico operavelmente ligado a uma porção lipídio. Em uma modalidade lipídios furtivos em uma formulação lipossômica protege a superfície de nanopartícula e, desse modo, reduz a opsonização por proteínas sanguíneas e captação pelos macrófagos do sistema de fagócito

mononuclear. Estruturas de lipídios furtivos adequadas para uso na presente invenção incluem, porém não estão limitados aos, por exemplo, compostos como fornecido na Fórmula XI e Fórmula XII. Outros lipídios furtivos contemplados e informação acerca da bioquímica de tais lipídios podem ser encontrados em Romberg e outro, *Pharmaceutical Research*, Volume 25, nº 1, 2008, páginas 55 a 71 e Hoekstra e outro, *Biochimica et Biophysica Acta* 1660 (2004) 41-52.

[000458] Em uma modalidade, o lipídio furtivo compreende um grupo selecionado de PEG (algumas vezes referido como poli(etileno óxido) e polímeros com base em poli(oxazolina), poli(álcool vinílico), poli(glicerol), poli(N-vinilpirrolidona), poliaminoácidos e poli[N-(2-hidroxipropil) metacrilamida]. Em uma modalidade o lipídio auxiliar é capaz de “proteger” como descrito em Romberg e outro. Lipídios furtivos específicos da invenção, por exemplo, na Fórmula XI e Fórmula XII, que podem ser também substituídos por alguém versado na técnica. Lipídios PEG adequados adicionais são descritos, por exemplo, no WO 2006/007712.

[000459] Lipídios furtivos adequados específicos incluem conjugados de olietilenoglicol-diacilglicerol ou polietilenoglicol-diacilglicamida (PEG-DAG) incluindo aqueles compreendendo um grupo dialquilglicerol ou dialquilglicamida tendo comprimento de cadeia de alquila independentemente compreendendo de cerca de C₄ a cerca de C₄₀ átomos de carbono saturados ou insaturados. O grupo dialquilglicerol ou dialquilglicamida pode também compreender um ou mais grupos alquila substituída. Em qualquer uma das modalidades descritas aqui, o conjugado de PEG pode ser selecionado de PEG-dilaurilglicerol, PEG-dimiristilglicerol (catálogo # GM-020 de NOF), PEG-dipalmitoilglicerol, PEG-disterilglicerol, PEG-dilaurilglicamida, PEG-dimiristilglicamida, PEG-dipalmitoilglicamida, e PEG-disterilglicamida,

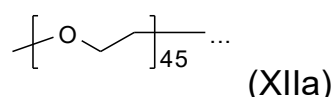
PEG-colesterol

(1-[8'-(Colest-5-en-3[beta]-óxi)carboxamido-3',6'-dioxaoctanil] carbamoil-[ômega]-metil-poli(etileno glicol), PEG-DMB (3,4-ditetradecoxilbenzil-[ômega]-metil-poli(etileno glicol) éter), S001, S002, S003, S004, S005, S006, S007, S008, S009, S010, S011, S012, S013, S014, S015, S016, S017, S018, S019, S020, S021, S022, S023, S024, S025, S026, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metóxi(polietileno glicol)-2000] (catálogo # 880150P de Avanti Polar Lipids). S010 e S011 são descritos no WO 2009/086558 sob os rótulos IVa e IVc, respectivamente.

[000460] A menos que de outro modo indicado, o termo “PEG” como usado aqui significa qualquer polietileno glicol ou outro polímero de polialquileno éter. Em uma modalidade, PEG é um opcionalmente substituído polímero linear ou ramificado de etileno glicol ou etileno óxido. Em uma modalidade PEG é não substituído. Em uma modalidade o PEG é substituído, por exemplo, por um ou mais grupos alquila, alcóxi, acila ou arila. Em uma modalidade, o termo inclui copolímeros de PEG tais como PEG-poliuretano ou PEG-polipropileno (veja, por exemplo, J. Milton Harris, Poli(etileno glicol) chemistry: biotechnical and biomedical applications (1992)); em uma modalidade, o termo não inclui copolímeros de PEG. Em uma modalidade, o PEG tem um peso molecular de cerca de 130 a cerca de 50.000, em uma submodalidade cerca de 150 a cerca de 30.000, em uma submodalidade cerca de 150 a cerca de 20.000, em uma submodalidade cerca de 150 a cerca de 15.000, em uma submodalidade cerca de 150 a cerca de 10.000, em uma submodalidade cerca de 150 a cerca de 6000, em uma submodalidade cerca de 150 a cerca de 5000, em uma submodalidade cerca de 150 a cerca de 4000, em uma submodalidade cerca de 150 a cerca de 3000, em uma submodalidade cerca de 300 a cerca de 3000, em uma

submodalidade cerca de 1000 a cerca de 3000, e em uma submodalidade cerca de 1500 a cerca de 2500.

[000461] Em certas modalidades o PEG é um “PEG-2K”, também denominado “PEG 2000”, que tem um peso molecular médio de cerca de 2000 dáltons. PEG-2K é representado aqui pela seguinte Fórmula (XIIa), em que n é 45, significando que o grau de média de número de polimerização compreende cerca de 45 subunidades. Entretanto, outra modalidade de PEG conhecida na técnica pode ser usada, incluindo, por exemplo, aquelas onde o grau o grau de média de número de polimerização compreende cerca de 23 subunidades (n = 23) e/ou 68 subunidades (n = 68).



Definições para Interferência de RNA e Formulações de RNAi

[000462] Por “nanopartícula de lipídio” entende-se uma partícula que compreende uma pluralidade de (isto é, mais do que uma) moléculas de lipídio fisicamente associadas umas com as outras por forças intramoleculares. As nanopartículas de lipídio podem ser, por exemplo, microesferas (incluindo vesículas unilamelares e multilamelares, por exemplo, lipossomas), uma fase dispersa em uma emulsão, micelas, ou uma fase interna em uma suspensão.

[000463] As nanopartículas de lipídio têm um tamanho de cerca de 1 a cerca de 2,500 nm, cerca de 1 a cerca de 1,500 nm, cerca de 1 a cerca de 1,000 nm, em uma submodalidade cerca de 50 a cerca de 600 nm, em uma submodalidade cerca de 50 a cerca de 400 nm, em uma submodalidade cerca de 50 a cerca de 250 nm, e em uma submodalidade cerca de 50 a cerca de 150 nm. A menos que indicado de outro modo, todos os tamanhos referidos aqui são os tamanhos médio (diâmetros) da nanopartícula completamente formada, quando avaliados por dispersão de luz dinâmica em um Malvern Zetasizer. A

amostra de nanopartícula é diluída em salina tamponada por fosfato (PBS) de modo que a taxa de contagem seja aproximadamente de 200 – 400 kcts. Os dados são apresentados com uma média ponderada da medida de intensidade.

[000464] Em uma modalidade, o agente biologicamente ativo está associado com a nanopartícula de lipídio (por exemplo, vesícula), e é preferivelmente encapsulado desse modo.

[000465] Em uma modalidade, a nanopartícula de lipídio compreende um agente biologicamente ativo, um composto da invenção, um lipídio neutro, um lipídio auxiliar e um lipídio furtivo.

[000466] Em uma modalidade, as partículas de lipossoma são estáveis em soro.

[000467] O termo “ácido nucleico de interferência curto” (siNA) como usado aqui se refere a qualquer molécula de ácido nucleico capaz de inibir ou sub-regular a expressão de gene ou replicação viral mediando-se a interferência RNA (RNAi) ou silenciamento de gene de uma maneira específica de sequência. Isto inclui RNA de interferência curto (siRNA), microRNA (miRNA), oligonucleotídeos de interferência curtos e moléculas de ácido nucleico de interferência curto quimicamente modificadas. siRNAs são responsáveis pela interferência de RNA, o processo de silenciamento de gene pós-transcricional específico de sequência em animais e plantas. siRNAs são gerados por clivagem de ribonuclease III de RNA de filamento duplo mais longo (dsRNA) que são homólogos a, ou específicos do gene-alvo silenciado.

[000468] Por “interferência de RNA” (RNAi) entende-se um processo biológico de inibição ou sub-regulação de expressão de gene em uma célula como é geralmente conhecido na técnica, veja, por exemplo, Zamore e Haley, 2005, Science, 309, 1519-1524; Zamore e outro, 2000, Cell, 101, 25-33; Elbashir e outro, 2001, Nature, 411, 494-498; e

Kreutzer e outro, Publicação de PCT WO 00/44895; Fire, Publicação de PCT WO 99/32619; Mello e Fire, Publicação de PCT WO 01/29058; e similares.

[000469] Como usado aqui, RNAi é equivalente a outros termos usados para descrever a interferência de RNA específica, tal como silenciamento de gene pós-transcricional, inibição translacional, inibição transcricional, ou epigenéticos. Por exemplo, as formulações contendo lipídios da invenção podem ser usadas em conjunção com moléculas de siNA para epigeneticamente silenciar os genes tanto no nível pós-transcricional quanto no nível pré-transcricional. Em um exemplo não limitante, a modulação de expressão de gene por moléculas de siNA pode resultar de clivagem mediada por siNA de RNA (RNA de codificação ou não codificação) por meio de RISC, ou alternativamente, inibição translacional como é conhecido na técnica. Em outra modalidade, modulação de expressão de gene por siNA pode resultar de inibição transcricional tal como é reportado, por exemplo, em Janowski e outro, 2005, *Nature Chemical Biology*, 1, 216-222.

[000470] Por “inibidor de RNAi” entende-se qualquer molécula que pode submodular (por exemplo, reduzir ou inibir) a atividade ou função de interferência de RNA em uma célula ou paciente. Um inibidor de RNAi pode sub-regular, reduzir ou inibir o RNAi (por exemplo, clivagem mediada por RNAi de um polinucleotídeo alvo, inibição translacional, ou silenciamento transcricional) por interação com ou interferindo com a função de qualquer componente da série de reação de RNAi, incluindo componentes de proteína tal como RISC, ou componentes de ácido nucleico tais como miRNAs ou siRNAs. Um inibidor de RNAi pode ser uma molécula de siNA, uma molécula anti-senso, um aptâmero, ou uma molécula pequena que interage com ou interfere com a função de RISC, um miRNA, ou um siRNA ou qualquer

outro componente da série de reação de RNAi em uma célula ou paciente. Inibindo-se o RNAi (por exemplo, clivagem mediada por RNAi de um polinucleotídeo alvo, inibição translacional, ou silenciamento transcricional), um inibidor de RNAi pode ser usado para modular (por exemplo, super-regular ou sub-regular) a expressão de um gene-alvo. Em uma modalidade, um inibidor de RNA é usado para super-regular expressão de gene interferindo com (por exemplo, reduzindo ou prevenindo) a inibição ou sub-regulação endógena de expressão de gene através da inibição translacional, silenciamento transcricional, ou clivagem mediada por RISC de um polinucleotídeo (por exemplo, mRNA). Por interferência com mecanismos de repressão endógena, silenciamento, ou inibição de expressão de gene, inibidores de RNAi da invenção podem, portanto, ser usados para super-regular expressão de gene para o tratamento de doenças ou condições resultantes de uma perda de função. O termo “inibidor de RNAi” é usado alternadamente com o termo “siNA” em várias modalidades aqui.

[000471] O termo “ácido nucleico enzimático” como usado aqui se refere a uma molécula de ácido nucleico que tem complementaridade em uma região de ligação de substrato a um gene-alvo específico, e também tem uma atividade enzimática que age para especificamente clivar um RNA alvo, desse modo inativando a molécula de RNA alvo. As regiões de complementaridade permitem a hibridização da molécula enzimática de ácido nucleico ao RNA alvo e, desse modo, permitem a clivagem. Complementaridade de 100% é preferida, porém complementaridade tão baixa quanto 50 a 75% pode também ser útil nesta invenção (veja, por exemplo, Werner e Uhlenbeck, 1995, *Nucleic Acids Research*, 23, 2092-2096; Hammann e outro, 1999, *Antisense and Nucleic Acid Drug Dev.*, 9, 25-31). Os ácidos nucleicos podem ser modificados nos grupos de base, açúcar, e/ou fosfato. O termo ácido

nucleico enzimático é usado alternadamente com frases tais como ribozimas, RNA catalítico, RNA enzimático, DNA catalítico, aptazima ou ribozima de ligação de aptâmero, ribozima regulável, oligonucleotídeos catalíticos, nucleozima, DNAzima, enzima de RNA, endoribonuclease, endonuclease, minizima, leadzima, oligozima ou enzima de DNA. Todas estas terminologias descrevem as moléculas de ácido nucleico com atividade enzimática. As características chave de uma molécula enzimática de ácido nucleico são que ela tem um sítio de ligação de substrato específico que é complementar a uma ou mais regiões de ácido nucleico-alvo, e que ele tem sequências de nucleotídeo ou circundantes daquele sítio de ligação de substrato que conferem uma clivagem de ácido nucleico e/ou atividade de ligação à molécula (veja, por exemplo, Cech e outro, Patente dos Estados Unidos 4.987.071; Cech e outro, 1988, 260 JAMA 3030). Ribozimas e moléculas de ácido nucleico enzimático da invenção podem ser quimicamente modificadas, por exemplo, como descrito na técnica e em outra parte aqui.

[000472] O termo “ácido nucleico anti-senso”, como usado aqui, se refere a uma molécula não enzimática de ácido nucleico que se liga ao RNA alvo por meio de interações de RNA-RNA ou RNA-DNA ou RNA-PNA (ácido nucleico de proteína; Egholm e outro, 1993 Nature 365, 566) e altera a atividade do RNA alvo (para uma revisão, veja Stein e Cheng, 1993 Science 261, 1004 e Woolf e outro, Patente dos Estados Unidos 5.849.902). DNA anti-senso pode ser quimicamente sintetizado ou expresso por meio do uso de um vetor de expressão de DNA de filamento simples ou equivalente do mesmo. Moléculas anti-senso da invenção podem ser quimicamente modificadas, por exemplo, como descrito na técnica.

[000473] O termo “região de ativação de RNase H” como usado aqui, se refere a uma região (geralmente maior do que ou igual a 4 a 25

nucleotídeos em comprimento, preferivelmente de 5 a 11 nucleotídeos em comprimento) de um molécula de ácido nucleico capaz de ligar-se a um RNA alvo para formar um complexo não covalente que é reconhecido por enzima RNase H celular (veja, por exemplo, Arrow e outro, Patente dos Estados Unidos 5.849.902; Arrow e outro, Patente dos Estados Unidos 5.989.912). A enzima RNase H que se liga ao complexo de molécula de ácido nucleico-RNA alvo e cliva a sequência de RNA alvo.

[000474] O termo “quimera 2-5A anti-senso” como usado aqui, se refere a um oligonucleotídeo anti-senso contendo um resíduo de adenilato 2'-5'-ligado 5'-fosforilado. Estas quimeras se ligam ao RNA alvo de uma maneira específica de sequência e ativam uma ribonuclease dependente de 2-5A celular que, por sua vez, cliva o RNA alvo (Torrence e outro, 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1300; Silverman e outro, 2000, Methods Enzimol., 313, 522-533; Player e Torrence, 1998, Pharmacol. Ther., 78, 55-113). Moléculas de quimera 2-5A anti-senso podem ser modificadas quimicamente, por exemplo, como descrito na técnica. O termo “oligonucleotídeos formadores de tríplex” como usado aqui, se refere a um oligonucleotídeo que pode ligar-se a um DNA de filamento duplo de uma maneira específica de sequência para formar uma hélice de filamento triplo. A formação de tal estrutura de hélice tripla foi mostrada inibir transcrição do gene-alvo (Duval-Valentin e outro, 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 504; Fox, 2000, Curr. Med. Chem., 7, 17-37; Praseuth e outro, 2000, Biochim. Biophys. Acta, 1489, 181-206). Moléculas de oligonucleotídeo de formação de tríplex da invenção podem ser quimicamente modificadas, por exemplo, como descrito na técnica.

[000475] O termo “RNA isca” como usado aqui, se refere a uma molécula de RNA ou aptâmero que é designado para preferencialmente ligar-se a um ligante predeterminado. Tal ligação pode resultar

na inibição ou ativação de uma molécula alvo. O RNA isca ou aptâmero pode competir com um alvo de ligação de ocorrência natural para a ligação de um ligante específico. Similarmente, um RNA isca pode ser designado ligar-se a um receptor e bloquear a ligação de uma molécula efetora, ou pode ser designado ligar-se ao receptor de interesse e impedir a interação com o receptor. Moléculas isca da invenção podem ser modificadas quimicamente, por exemplo, como descrito na técnica.

[000476] O termo “DNA de filamento simples” (ssDNA) como usado aqui se refere a uma molécula de ácido desoxirribonucleico de ocorrência natural ou sintética compreendendo um filamento simples linear, por exemplo, um ssDNA pode ser uma sequência de gene de senso ou anti-senso ou EST (Rótulo de Sequência Expressa).

[000477] O termo “alozima” como usado aqui se refere a uma molécula de ácido nucleico enzimático alostérica, incluindo, por exemplo, Patentes dos Estados Unidos n^{os} 5.834.186, 5.741.679, 5.589.332, 5.871.914, e Publicações de PCT n^{os} WO 00/24931, WO 00/26226, WO 98/27104, e WO 99/29842.

[000478] Por “aptâmero” como usado aqui se entende uma composição de polinucleotídeo que se liga especificamente a uma molécula alvo, em que o polinucleotídeo tem uma sequência que se difere de uma sequência normalmente conhecida pela molécula alvo em uma célula. Alternativamente, um aptâmero pode ser uma molécula de ácido nucleico que se liga a uma molécula alvo onde a molécula alvo não se liga naturalmente a um ácido nucleico. A molécula alvo pode ser qualquer molécula de interesse. Moléculas de aptâmero da invenção podem ser quimicamente modificadas, por exemplo, como descrito na técnica.

[000479] Por “modular” entende-se que a expressão do gene, ou nível de molécula de RNA ou moléculas de RNA equivalentes

codificando uma ou mais proteínas ou subunidades de proteína, ou atividade de uma ou mais proteínas ou subunidades de proteínas é super-regulada ou sub-regulada, ou é ausente, de modo que a expressão, nível, ou atividade é maior do que ou menor do que aquele observado sem o modulador. Por exemplo, em uma modalidade, o termo “modular” significa “inibir”. Em uma modalidade, modulação de uma série de reação significa, dentro dos termos da invenção, uma super-regulação ou uma sub-regulação de um componente terapeuticamente significativo e/ou finalidade de uma série de reação biológica que contém, ou é regulada, por exemplo, pela proteína, enzima, ou substância sendo alvejada ou codificada pelo mRNA alvo.

[000480] Por “inibir”, “sub-regular”, ou “reduzir”, entende-se que a expressão do gene, ou nível de moléculas de RNA ou moléculas de RNA equivalentes codificando uma ou mais proteínas ou subunidades de proteína, ou atividade de uma ou mais proteínas ou subunidades de proteína, é reduzido abaixo daquele observado em um ambiente natural, por exemplo, na ausência das moléculas de ácido e (por exemplo, siNA). Em uma modalidade, inibição, sub-regulação ou redução com uma molécula de siNA está abaixo daquele nível observado na presença de uma molécula inativa ou atenuada. Em uma modalidade, inibição, sub-regulação, ou redução com moléculas de siNA está abaixo daquele nível observado na presença de, por exemplo, uma molécula de siNA com sequência misturada ou com pareamentos errôneos. Em uma modalidade, inibição, sub-regulação, ou redução de expressão de gene com uma molécula de ácido nucleico é maior na presença da molécula de ácido nucleico do que na sua ausência. Em uma modalidade, inibição, sub-regulação, ou redução de expressão de gene está associada com silenciamento pós-transcricional, tal como clivagem mediada por RNAi de uma molécula alvo de ácido nucleico (por exemplo, RNA) ou inibição de translação.

Em uma modalidade, inibição, sub-regulação, ou redução de expressão de gene está associada com silenciamento pré-transcricional.

[000481] Por “super-regular”, ou “promover”, entende-se que a expressão do gene, ou nível de moléculas de RNA ou moléculas de RNA equivalentes codificando uma ou mais proteínas ou subunidades de proteína, ou atividade de uma ou mais proteínas ou subunidades de proteína, é aumentado acima daquele observado em um ambiente natural, por exemplo, na ausência das moléculas do ácido nucleico (por exemplo, siNA). Em uma modalidade, super-regulação ou promoção de expressão de gene com uma molécula de siNA está acima daquele nível observado na presença de uma molécula inativa ou atenuada. Em uma modalidade, super-regulação ou promoção de expressão de gene com moléculas de siNA está acima daquele nível observado na presença de, por exemplo, uma molécula de siNA com sequência misturada ou com pareamentos errôneos. Em uma modalidade, super-regulação ou promoção de expressão de gene com uma molécula de ácido nucleico é maior na presença da molécula de ácido nucleico do que na sua ausência. Em uma modalidade, super-regulação ou promoção de expressão de gene está associada com inibição de silenciamento de gene mediado por RNA, tal como clivagem mediada por RNAi ou silenciamento de um alvo de RNA de codificação ou não-codificação que sub-regula, inibe, ou silencia a expressão do gene de interesse a ser super-regulado.

[000482] Por “gene”, ou “gene-alvo”, entende-se um ácido nucleico que codifica o RNA, por exemplo, sequências de ácido nucleico incluindo, porém não limitado a genes estruturais codificando um polipeptídeo. Um gene ou gene-alvo pode também codificar um RNA funcional (FRNA) ou RNA de não codificação (ncRNA), tal como RNA temporal pequeno (stRNA), micro RNA (miRNA), RNA nuclear

pequeno (snRNA), RNA de interferência curto (siRNA), RNA nucleolar pequeno (snRNA), RNA ribossômico (rRNA), RNA de transferência (tRNA) e RNAs precursores dos mesmos. Tais RNAs de não codificação podem funcionar como moléculas de ácido nucleico-alvo quanto à interferência de RNA mediada por siNA na modulação de atividade de FRNA ou ncRNA envolvida nos processos celulares funcionais ou reguladores. Atividade de FRNA ou ncRNA anormal que induz à doença pode, portanto, ser modulada por moléculas de siNA.

[000483] Por “alvo” como usado aqui significa qualquer proteína, peptídeo ou polipeptídeo alvo por um gene-alvo. O termo “alvo” também se refere às sequências de ácido nucleico codificando qualquer proteína, peptídeo, ou polipeptídeo alvo tendo atividade alvo, tal como codificado por RNA alvo. O termo “alvo” destina-se também a incluir outra sequência de codificação alvo, tal como outras isoformas alvo, genes alvo mutantes, variantes de ligação de gene-alvos, e polimorfismos de gene-alvo. Por “ácido nucleico-alvo” entende-se qualquer sequência de ácido nucleico cuja expressão ou atividade deve ser modulada. O ácido nucleico-alvo pode ser DNA ou RNA.

[000484] Por “par de base não canônico” entende-se qualquer par de base não Watson Crick, tal como pareamentos errôneos e/ou base oscilante.

[000485] Por “região de senso” entende-se uma sequência de nucleotídeo de uma molécula de siNA tendo complementaridade a uma região anti-senso da molécula de siNA. Além disso, a região de senso de uma molécula de siNA pode compreender uma sequência de ácido nucleico tendo homologia com uma sequência de ácido nucleico. Em uma modalidade, a região de senso da molécula de siNA é referida como o filamento de senso ou filamento passageiro.

[000486] Por “região anti-senso” entende-se uma sequência de nucleotídeo de uma molécula de siNA tendo complementaridade a

uma sequência de ácido nucleico-alvo. Além disso, a região anti-senso de uma molécula de siNA pode opcionalmente compreender uma sequência de ácido nucleico tendo complementaridade a uma região de senso da molécula de siNA. Em uma modalidade, a região anti-senso da molécula de siNA é referida como o filamento anti-senso ou filamento guia.

[000487] Por “ácido nucleico-alvo” ou “polinucleotídeo alvo” entende-se qualquer sequência de ácido nucleico cuja expressão ou atividade deve ser modulada. O ácido nucleico-alvo pode ser DNA ou RNA. Em uma modalidade, um ácido nucleico-alvo da invenção é RNA alvo. Em uma modalidade, um ácido nucleico-alvo da invenção é DNA alvo.

[000488] Por “complementaridade” entende-se que um ácido nucleico pode formar ligação(s) de hidrogênio com outra sequência de ácido nucleico por Watson-Crick tradicional ou outros tipos não tradicionais tais como pareamento de base Hoogsteen. Em uma modalidade, uma molécula de ácido nucleico de filamento duplo da invenção, tais como uma molécula de siNA, em que cada filamento está entre 15 e 40 nucleotídeos em comprimento, compreende entre cerca de 10% e cerca de 100% (por exemplo, cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, ou 100%) complementaridade entre os dois filamentos da molécula de ácido nucleico de filamento duplo. Um percentual de complementaridade indica a porcentagem de resíduos contíguos em uma molécula de ácido nucleico que pode parear através da formação de ligações de hidrogênio (por exemplo, pareamento de base Watson-Crick) com uma sequência de ácido nucleico.

Termos químicos e Definições

[000489] Para propósitos de interpretação deste relatório descritivo, as seguintes definições se aplicarão e quando apropriado, os termos usados no singular também incluirão o plural e *vice versa*.

Halo

[000490] Como usado aqui, o termo “halogênio” ou “halo” se refere a flúor, cloro, bromo, e iodo. O termo “halogênio” (ou “halo”) inclui flúor, cloro, bromo e iodo.

[000491] Como usado aqui, o termo “haloalquila” se refere a uma alquila como definido aqui que é substituída por um ou mais grupos halo como definido aqui. A haloalquila pode ser monoaloalquila, dialoalquila ou polialoalquila incluindo perhaloalquila. Uma monoaloalquila pode ter um iodo, bromo, cloro ou flúor dentro do grupo alquila. Grupos dialoalquila e polialoalquila podem ter dois ou mais dos mesmos átomos de halo ou uma combinação de diferentes grupos halo dentro da alquila. Tipicamente a polialoalquila contém até 12, ou 10, ou 8, ou 6, ou 4, ou 3, ou 2 grupos halo. Exemplos não limitantes de haloalquila incluem fluorometila, difluorometila, trifluorometila, clorometila, diclorometila, triclorometila, pentafluoroetila, heptafluoropropila, difluoroclorometila, diclorofluorometila, difluoroetila, difluoropropila, dicloroetila e dicloropropila. Um perhaloalquila se refere a uma alquila tendo todos os átomos de hidrogênio substituídos com átomos de halo.

Alquila, Alquileno, Alquenila, Alquinila, Cicloalquila, etc.

[000492] Os termos “alquila”, “alquileno”, “alquenila” e “alquinila” são usados aqui para referir-se tanto às formas acíclicas de cadeia linear quanto ramificada. Análogos cíclicos dos mesmos são referidos como cicloalquila, cicloalquenila, *etc.*

[000493] O termo “alquila” inclui grupos hidrocarbila cíclicos monovalentes, lineares ou ramificados, saturados. Como usado aqui, o termo “alquila” se refere a uma porção hidrocarboneto totalmente saturado ramificado ou não ramificado tendo até 50 átomos de carbono. A menos que de outro modo fornecido, alquila se refere à porções hidrocarboneto tendo 1 a 50 átomos de carbono, 1 a 40 átomos de

carbono, 1 a 30 átomos de carbono, 1 a 20 átomos de carbono, 1 a 16 átomos de carbono, 1 a 10 átomos de carbono, 1 a 7 átomos de carbono, ou 1 a 4 átomos de carbono. Exemplos representativos de alquila incluem, porém não estão limitados a, metila, etila, *n*-propila, *iso*-propila, *n*-butila, *sec*-butila, *iso*-butila, *terc*-butila, *n*-pentila, isopentila, neopentila, *n*-hexila, 3-metilhexila, 2,2- dimetilpentila, 2,3-dimetilpentila, *n*-heptila, *n*-octila, *n*-nonila, *n*-decila e similares. Em uma modalidade alquila é C₁₋₁₀alquila, em outra modalidade C₁₋₆alquila, em outra modalidade C₁₋₄alquila, tal como grupos metila, etila, *n*-propila, *i*-propila ou *t*-butila.

[000494] O termo “cicloalquila” inclui grupos hidrocarbila monovalentes, saturados, cíclicos. Em uma modalidade cicloalquila é C₃₋₁₀cicloalquila, em outra modalidade C₃₋₆cicloalquila tais como ciclopentila e cicloexila.

[000495] O termo “alcóxi” significa alquil-O-, em que alquila é definida aqui acima. Exemplos representativos de alcóxi incluem, porém não estão limitados a metóxi, etóxi, propóxi, 2-propóxi, butóxi, *terc*-butóxi, pentilóxi, hexilóxi, ciclopropilóxi-, cicloexilóxi- e similares. Tipicamente, grupos alcóxi têm cerca de 1 a 7, mais preferivelmente cerca de 1 a 4 carbonos.

[000496] O termo “alquenila” inclui grupos hidrocarbila acíclicos, monovalentes, lineares ou ramificados, insaturados tendo pelo menos uma ligação dupla de carbono-carbono e, em uma modalidade, nenhuma ligação tripla de carbono-carbono. Como usado aqui, o termo “alquilenos” se refere um grupo alquila como definido aqui acima tendo 1 a 50 átomos de carbono. Ele compreende 1 a 50 átomos de carbono, a menos que de outro modo fornecido, alquilenos se refere a porções tendo 1 a 50 átomos de carbono, 1 a 40 átomos de carbono, 1 a 30 átomos de carbono, 1 a 20 átomos de carbono, 1 a 16 átomos de carbono, 1 a 10 átomos de carbono, 1 a 7 átomos de carbono, ou 1 a 4

átomos de carbono. Exemplos representativos de alquilenos incluem, porém não estão limitados a metileno, etileno, *n*-propileno, *iso*-propileno, *n*-butileno, *sec*-butileno, *iso*-butileno, *terc*-butileno, *n*-pentileno, *iso*-pentileno, neopentileno, *n*-hexileno, 3-metilhexileno, 2,2-dimetilpentileno, 2,3-dimetilpentileno, *n*-heptileno, *n*-octileno, *n*-nonileno, *n*-decileno e similares. Em uma modalidade alquenila é C₂₋₁₀alquenila, em outra modalidade C₂₋₆alquenila, em outra modalidade C₂₋₄alquenila.

[000497] O termo “cicloalquenila” inclui grupos hidrocarbila cíclica, monovalentes, parcialmente insaturado tendo pelo menos uma ligação dupla de carbono-carbono. Em uma modalidade cicloalquenila é C₃₋₁₀cicloalquenila, em outra modalidade C₅₋₁₀cicloalquenila, por exemplo, cicloexenila.

[000498] O termo “alquinila” inclui grupos hidrocarbila acíclicos, monovalentes, lineares ou ramificados, insaturados tendo pelo menos uma ligação tripla de carbono-carbono e, em uma modalidade, nenhuma ligação de carbono-carbono. Em uma modalidade, alquinila é C₂₋₁₀alquinila, em outra modalidade C₂₋₆alquinila, em outra modalidade C₂₋₄alquinila.

[000499] O termo “cicloalquinila” inclui grupos hidrocarbila cíclica monovalentes, parcialmente insaturados tendo pelo menos uma ligação tripla de carbono-carbono. Em uma modalidade cicloalquinila é C₆₋₁₀cicloalquenila, em outra modalidade C₈₋₁₀cicloalquinila.

[000500] O termo “alquileno” inclui grupos hidrocarbila acíclica divalente, lineares ou ramificados, saturada. Em uma modalidade alquileno é C₁₋₁₀alquileno, em outra modalidade C₁₋₆alquileno, em outra modalidade C₁₋₄alquileno, tal como grupos metileno, e tileno, *n*-propileno, *i*-propileno ou *t*-butileno.

[000501] O termo “alquenileno” inclui grupos hidrocarbila acíclica divalente, lineares ou ramificados, insaturados tendo pelo menos uma

ligação dupla de carbono-carbono e, em uma modalidade, nenhuma ligação tripla de carbono-carbono. Em uma modalidade alquênileno é C₂₋₁₀alquênileno, em outra modalidade C₂₋₆alquênileno, em outra modalidade C₂₋₄alquênileno.

[000502] O termo “alquinileno” inclui grupos hidrocarbila acíclica divalente, lineares ou ramificados, insaturados tendo pelo menos uma ligação tripla de carbono-carbono. Em uma modalidade alquinileno é C₂₋₁₀alquinileno, em outra modalidade C₂₋₆alquinileno, em outra modalidade C₂₋₄alquinileno.

Heteroalquila etc.

[000503] Como usado aqui, o termo “heteroátomos” se refere a átomos de nitrogênio (N), oxigênio (O), fósforo (P) ou enxofre (S), em particular nitrogênio ou oxigênio.

[000504] O termo “heteroalquila” inclui grupos alquila em que até seis átomos de carbono, em uma modalidade até cinco átomos de carbono, em outra modalidade até quatro átomos de carbono, em outra modalidade até três átomos de carbono, em outra modalidade até dois átomos de carbono, em outra modalidade um átomo de carbono, são cada qual independentemente substituídos por O, S(O)_q, N, P(O)_r ou Si (e preferivelmente O, S(O)_q ou N), contanto que pelo menos um dos átomos de carbono de alquila permaneça. O grupo heteroalquila pode ser ligado por C ou ligado por hetero, isto é, ele pode ser ligado ao restante da molécula através de átomo de carbono ou através de O, S(O)_q, N, P(O)_r ou Si. Observe que S(O)_q e P(O)_r são definidos abaixo.

[000505] O termo “heterocicloalquila” inclui grupos cicloalquila em que até seis átomos de carbono, em uma modalidade até cinco átomos de carbono, em outra modalidade até quatro átomos de carbono, em outra modalidade até três átomos de carbono, em outra modalidade até dois átomos de carbono, em outra modalidade um átomo de carbono, são cada qual substituídos independentemente por

O, S(O)_q ou N, contanto que pelo menos um dos átomos de carbono de cicloalquila permaneça. Exemplos de grupos heterocicloalquila incluem oxiranila, tianila, aziridinila, oxetanila, tiatanila, azetidinila, tetra-hidrofuranila, tetra-hidrotiofenila, pirrolidinila, tetra-hidropiranila, tetra-hidrotiopiranila, piperidinila, 1,4-dioxanila, 1,4-oxatianila, morfolinila, 1,4-ditianila, piperazinila, 1,4-azatianila, oxepanila, tiepanila, azepanila, 1,4-dioxepanila, 1,4-oxatiepanila, 1,4-oxaazepanila, 1,4-ditiepanila, 1,4-tieazepanila e 1,4-diazepanila. O grupo heterocicloalquila pode ser ligado por C ou ligado por N, isto é, ele pode ser ligado ao restante da molécula através de um átomo de carbono ou através de um átomo de nitrogênio.

[000506] O termo “heteroalquenila” inclui grupos alquenila em que até três átomos de carbono, em uma modalidade até dois átomos de carbono, em outra modalidade um átomo de carbono, são cada qual substituídos independentemente por O, S(O)_q ou N, contanto que pelo menos uma ligação dupla de carbono-carbono de alquenila permaneça. O grupo heteroalquenila pode ser ligante por C ou ligado por hetero, isto é, ele pode ser ligado ao restante da molécula através de um átomo de carbono ou através de O, S(O)_q ou N.

[000507] O termo “heterocicloalquenila” inclui grupos cicloalquenila em que até três átomos de carbono, em uma modalidade até dois átomos de carbono, em outra modalidade um átomo de carbono são, cada qual substituídos independentemente por O, S(O)_q ou N, contanto que pelo menos uma ligação dupla de carbono-carbono de cicloalquenila permaneça. Exemplos de grupos heterocicloalquenila incluem 3,4-di-hidro-2H-piranila, 5-6-di-hidro-2H-piranila, 2H-piranila, 1,2,3,4-tetra-hidropiridinila e 1,2,5,6-tetra-hidropiridinila. O grupo heterocicloalquenila pode ser ligado por C ou ligado por N, isto é, ele pode ser ligado ao restante da molécula através de um átomo de carbono ou através de um átomo de nitrogênio. Em uma modalidade,

grupos heterocicloalquenila da invenção incluem grupos C₃-C₁₀ cicloalquenila. Em uma modalidade, grupos heterocicloalquenila da invenção incluem grupos C₅-C₁₀ cicloalquenila.

[000508] O termo “heteroalquinila” inclui grupos alquinila em que até três átomos de carbono, em uma modalidade até dois átomos de carbono, em outra modalidade um átomo de carbono, são cada qual substituídos independentemente por O, S(O)_q ou N, contanto que pelo menos uma ligação tripla de carbono-carbono de alquila permaneça. O grupo heteroalquinila pode ser ligado por C ou ligado por hetero, isto é, ele pode ser ligado ao restante da molécula através de um átomo de carbono ou através de O, S(O)_q ou N.

[000509] O termo “heterocicloalquinila” inclui grupos cicloalquinila em que até três átomos de carbono, em uma modalidade até dois átomos de carbono, em outra modalidade um átomo de carbono, são cada qual substituídos independentemente por O, S(O)_q ou N, contanto que pelo menos uma das ligações triplas de carbono-carbono de cicloalquinila permaneça. O grupo heterocicloalquenila pode ser ligado por C ou ligado por N, isto é, ele pode ser ligado ao restante da molécula através de um átomo de carbono ou através de um átomo de nitrogênio. Um exemplo de um grupo heterocicloalquinila inclui azaciclooct-4-ina. Em uma modalidade, a invenção inclui grupos C₃-C₁₀ heterocicloalquinila. Em uma modalidade, a invenção inclui grupos C₅-C₁₀ heterocicloalquinila.

[000510] O termo “heteroalquileno” inclui grupos alquileno em que até três átomos de carbono, em uma modalidade até dois átomos de carbono, em outra modalidade um átomo de carbono, são cada qual substituídos independentemente por O, S(O)_q ou N, contanto que pelo menos uma ligação de carbono-carbono de alquileno permaneça.

[000511] O termo “heteroalquenileno” inclui grupos alquenileno em que até três átomos de carbono, em uma modalidade até dois átomos

de carbono, em outra modalidade um átomo de carbono, são cada qual substituídos independentemente por O, S(O)_q ou N, contanto que pelo menos uma ligação dupla de carbono-carbono alquênico permaneça.

[000512] O termo “heteroalquínico” inclui grupos alquínico em que até três átomos de carbono, em uma modalidade até dois átomos de carbono, em outra modalidade um átomo de carbono, são cada qual substituídos independentemente por O, S(O)_q ou N, contanto que pelo menos uma ligação tripla de carbono-carbono de alquínico permaneça.

Arila

[000513] O termo “arila” inclui grupos hidrocarbila monovalentes cíclicos, aromáticos, tais como fenila ou naftila (por exemplo, 1-naftila ou 2-naftila). Em geral, os grupos arila podem ser grupos aromáticos de anel fundido monocíclico ou policíclico. Arila preferida é C₆-C₁₄ arila. Como usado aqui o termo “arila” se refere a um grupo hidrocarboneto aromático tendo 6 a 20 átomos de carbono na porção anel. Tipicamente, arila é monocíclica, bicíclica, ou tricíclica tendo de 6 a 20 átomos de carbono e inclui um ou mais anéis aromáticos fundidos a um ou mais anéis hidrocarbonetos não aromáticos. Exemplos não limitantes incluem fenila, naftila ou tetra-hidronaftila.

[000514] Outros exemplos de grupos arila são derivados monovalentes de aceantrileno, acenaftilaeno, acefenantrileno, antraceno, azuleno, criseno, coroneno, fluoranteno, fluoreno, as-indaceno, s-indaceno, indeno, naftaleno, ovaleno, perileno, fenaleno, fenantreno, piceno, pleiaden, pireno, pirantreno e Rubiceno.

[000515] O termo “arilalquila” significa alquila substituída com um grupo arila, por exemplo, benzila.

[000516] O termo “arileno” inclui grupos hidrocarbila cíclica divalente, cíclica, tais como fenileno. Em geral, os grupos arileno podem ser grupos

aromáticos de anel fundido monocíclico ou policíclico. Arileno preferido é C₆-C₁₄arileno. Outros exemplos de grupos arileno são derivados divalentes de aceantileno, acenaftilaeno, acefenantileno, antraceno, azuleno, criseno, coroneno, fluoranteno, fluoreno, as-indaceno, s-indaceno, indeno, naftaleno, ovaleno, perileno, fenaleno, fenantreno, piceno, pleiadeno, pireno, pirantreno e Rubiceno.

Heteroarila

[000517] O termo “heteroarila” inclui grupos hidrocarbila cíclica monovalentes, heteroaromáticos, adicionalmente contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionado de O, S, N e NR^N, onde R^N é definido abaixo (e em uma modalidade é H ou alquila (por exemplo, C₁₋₆alquila)). Como usado aqui, o termo "heteroarila" se refere a um sistema anel aromático monocíclico ou bicíclico ou tricíclico, tendo de 1 a 8 heteroátomos selecionados de N, O ou S. Tipicamente, a heteroarila é um sistema de membros de 5 a 10 (por exemplo, monociclo de 5 a 7 membros ou um biciclo de 8 a 10 membros) ou um sistema de anel de 5 a 10 membros. Grupos heteroarila típicos incluem 2- ou 3-tienila, 2- ou 3-furila, 2- ou 3-pirrolila, 2-, 4-, ou 5-imidazolila, 3-, 4-, ou 5-pirazolila, 2-, 4-, ou 5-tiazolila, 3-, 4-, ou 5-isotiazolila, 2-, 4-, ou 5-oxazolila, 3-, 4-, ou 5-isoxazolila, 3- ou 5-1,2,4-triazolila, 4- ou 5-1,2, 3-triazolila, tetrazolila, 2-, 3-, ou 4-piridila, 3- ou 4-piridazinila, 3-, 4-, ou 5-pirazinila, 2-pirazinila, e 2-, 4-, ou 5-pirimidinila.

[000518] O termo “heteroarila” também se refere a um grupo em que um anel heteroaromático é fundido a um ou mais grupos arila, cicloalifáticos, ou heterociclila, onde o radical ou ponto de ligação é no anel heteroaromático. Exemplos não limitantes incluem aqueles grupos cabeça fornecidos aqui como H¹⁵ e H²⁹.

[000519] Em geral, os grupos heteroarila podem ser grupos heteroaromáticos de anel fundido monocíclico ou policíclico (por

exemplo, bicíclico). Em uma modalidade, grupos heteroarila contém de 5 a 13 membros (por exemplo, 5 a 10 membros) e 1, 2, 3 ou 4 heteroátomos de anel independentemente selecionados de O, S, N e NR^{N} . Em uma modalidade, um grupo heteroarila pode ser de 5, 6, 9 ou 10 membros, por exemplo, monocíclico de 5 membros, monocíclico de 6 membros, anel bicíclico fundido de 9 membros ou anel bicíclico fundido de 10 membros.

[000520] Grupos heteroaromáticos monocíclicos incluem grupos heteroaromáticos contendo 5 a 6 membros de anel e 1, 2, 3 ou 4 heteroátomos selecionados de O, S, N ou NR^{N} .

[000521] Em uma modalidade, grupos heteroarila monocíclicos de 5 membros contêm 1 membro de anel que é um grupo $-\text{NR}^{\text{N}}-$, um átomo de $-\text{O}-$ ou um átomo de $-\text{S}-$ e, opcionalmente, 1 a 3 membros de anel (por exemplo, 1 ou 2 membros de anel) que são átomos de $=\text{N}-$ (onde o restante dos 5 membros de anel são átomos de carbono).

[000522] Exemplos de grupos heteroarila monocíclicos de 5 membros são pirrolila, furanila, tiofenila, pirazolila, imidazolila, isoxazolila, oxazolila, isotiazolila, tiazolila, 1,2,3 triazolila, 1,2,4 triazolila, 1,2,3 oxadiazolila, 1,2,4 oxadiazolila, 1,2,5 oxadiazolila, 1,3,4 oxadiazolila, 1,3,4 tiadiazolila, piridila, pirimidinila, piridazinila, pirazinila, 1,3,5 triazinila, 1,2,4 triazinila, 1,2,3 triazinila e tetrazolila.

[000523] Exemplos de grupos heteroarila monocíclicos de 6 membros são piridinila, piridazinila, pirimidinila e pirazinila.

[000524] Em uma modalidade, grupos heteroarila monocíclicos de 6 membros contêm 1 ou 2 membros de anel que são $=\text{N}-$ átomos (onde o restante dos 6 membros de anel são átomos de carbono).

[000525] Grupos heteroaromáticos bicíclicos incluem grupos heteroaromáticos de anel fundido contendo 9 a 13 membros de anel e 1, 2, 3, 4 ou mais heteroátomos selecionados de O, S, N ou NR^{N} .

[000526] Em uma modalidade, grupos heteroarila bicíclica de 9

membros contêm 1 membro de anel que é um grupo $-NR^N$, um átomo de $-O-$ ou um átomo de $-S-$ e, opcionalmente, 1 a 3 membros de anel (por exemplo, 1 ou 2 membros de anel) que são átomos de $=N-$ (onde o restante dos 9 membros de anel são átomos de carbono).

[000527] Exemplos de grupos heteroarila bicíclica de anel fundido de 9 membros são benzofuranila, benzotiofenila, indolila, benzimidazolila, indazolila, benzotriazolila, pirrolo[2,3-b]piridinila, pirrolo[2,3-c]piridinila, pirrolo[3,2-c]piridinila, pirrolo[3,2-b]piridinila, imidazo[4,5-b]piridinila, imidazo[4,5-c]piridinila, pirazolo[4,3-d]piridinila, pirazolo[4,3-c]piridinila, pirazolo[3,4-c]piridinila, pirazolo[3,4-b]piridinila, isoindolila, indazolila, purinila, indolinila, imidazo[1,2-a]piridinila, imidazo[1,5-a]piridinila, pirazolo[1,2-a]piridinila, pirrolo[1,2-b]piridazinila e imidazo[1,2-c]pirimidinila.

[000528] O termo “heteroarilalquila” significa alquila substituída com um grupo heteroarila.

[000529] O termo “heteroarileno” inclui grupos hidrocarbila divalente heteroaromática, cíclica adicionalmente contendo um ou mais heteroátomos independentemente selecionados de O, S, N e NR^N , onde R^N é definido abaixo (e em uma modalidade é H ou alquila (por exemplo, C_{1-6} alquila)). Em geral, os grupos heteroarileno podem ser grupos heteroaromáticos de anel fundido monocíclicos ou policíclicos (por exemplo, bicíclicos). Em uma modalidade, grupos heteroarileno contêm de 5 a 13 membros de anel (preferivelmente 5 a 10 membros) e 1, 2, 3 ou 4 heteroátomos de anel independentemente selecionados de O, S, N e NR^N . Em uma modalidade, um grupo heteroarileno pode ser de 5, 6, 9 ou 10 membros, por exemplo, monocíclico de 5 membros, monocíclico de 6 membros, anel bicíclico fundido de 9 membros ou anel bicíclico fundido de 10 membros. O termo “heteroarileno” inclui derivados divalentes de cada um dos grupos heteroarila descritos acima.

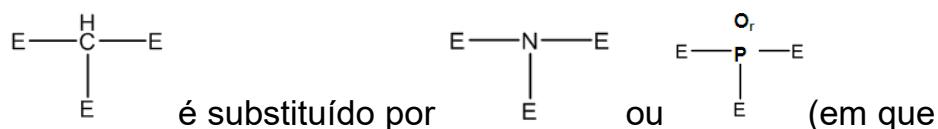
[000530] Os termos “arila”, “aromático”, “heteroarila” e “heteroaromático” também incluem grupos que são parcialmente reduzidos. Desse

modo, por exemplo, “heteroarila” inclui espécies fundidas em que um dos anéis foi reduzido a um anel saturado (por exemplo, 1,2,3,4-tetra-hidro-1,8-naftiridin-2-il).

Geral

[000531] A menos que indicado explicitamente de outro modo, onde combinações de grupos são referidas como uma porção, por exemplo, arilalquila, o último grupo mencionado contém o átomo pelo qual a porção é ligada ao resto da molécula.

[000532] Onde referência é feita a um átomo de carbono de um grupo alquila ou outro grupo sendo substituído por O, S(O)_q, N ou P(O)_r, o que é pretendido é que:



E não pode ser H);

–CH= é substituído por –N= ou –P(O)_r= ;

≡C–H é substituído por ≡N ou ≡P(O)_r; ou

–CH₂– é substituído por –O–, –S(O)_q–, –NR^N– ou –P(O)_rR^N–, onde R^N é H ou opcionalmente substituído C₁₋₆alquila, C₁₋₆heteroalquila, C₃₋₆cicloalquila, C₃₋₆heterocicloalquila, C₂₋₆alquenila, C₂₋₆heteroalquenila, C₃₋₆cicloalquenila, C₃₋₆heterocicloalquenila, fenila, ou heteroarila contendo 5 ou 6 membros de anel. R^N é preferivelmente H, C₁₋₆alquila ou C₃₋₆cicloalquil.

q é independentemente 0, 1 ou 2. Em uma modalidade, q é 0.

r é independentemente 0 ou 1. Em uma modalidade, r é 0.

[000533] Onde referência é feita a um átomo de carbono sendo substituído por Si, o que é pretendido é que o átomo de carbono é trocado por um átomo de silício, porém que as ligações de outro modo permaneçam iguais. Desse modo, por exemplo, –CH₂– é substituído por –SiH₂–; –CH= é substituído por –SiH=; e ≡C–H é substituído por ≡Si–H.

[000534] Por meio de clarificação, com relação aos grupos contendo heteroátomo acima mencionados (tal como heteroalquila *etc.*), onde um numérico de átomos de carbono é fornecido, por exemplo, C₃₋₆heteroalquila, que é pretendido é um grupo com base em C₃₋₆alquila em que um ou mais dos 3 a 6 átomos de carbono da cadeia é substituído por O, S(O)_q ou N. Consequentemente, um grupo C₃₋₆heteroalquila pode, por exemplo, conter menos do que 3 a 6 átomos de carbono da cadeia. Como outro exemplo, um grupo piridila pode ser classificado um grupo C₆ heteroarila mesmo que embora ele contenha 5 átomos de carbono.

[000535] Em que referência é feita a um grupo funcional específico ou porção química fornecida abaixo, a entidade química pretendida é como segue:

[000536] éter (por exemplo, -O-); éster (por exemplo, -C(O)O-); succinato (por exemplo, -O(O)C-CH₂-CH₂-C(O)O-); carbamato (por exemplo, -OC(O)-NR'-); carbonato (por exemplo, -OC(O)O-); cetona (por exemplo, -C-C(O)-C-); carbonila (por exemplo, -C(O)-); ureia (por exemplo, -NRC(O)NR'-); amina (por exemplo, -NR'-); amida (por exemplo, -C(O)NR'-); imina (por exemplo, -C(NR')-); tioéter (por exemplo, -S-); xantato (por exemplo, -OC(S)S-); fosfodiéster (por exemplo, -OP(O)₂O-); em que R' pode ser independentemente selecionado de H, -NH-, -O-, -S-, um fosfato ou um C₁₋₁₀ alquilenos opcionalmente substituído.

pKa

[000537] A menos que explicitamente indicado de outro modo, todos os pKas referidos aqui são medidos em água em temperatura e pressão padrões. Além disso, a menos que de outro modo indicado, todas as referências ao pKa são referências ao pKa medido usando a seguinte técnica.

[000538] Solução a 2 mM de lipídio em etanol é preparada pesando-

se o lipídio e em seguida dissolvendo-se em etanol. Solução a 0,3 mM de sonda TNS fluorescente em etanol:metanol 9:1 é preparada primeiro preparando a solução a 3 mM de TNS em metanol e em seguida diluindo-se para 0,3 mM com etanol.

[000539] Um tampão aquoso contendo fosfato de sódio, citrato de sódio, acetato de sódio e cloreto de sódio, nas concentrações 20 mM, 25 mM, 20 mM e 150 mM, respectivamente, é preparado. O tampão é dividido em oito partes e o pH ajustado com HCl a 12 N ou NaOH a 6 N para 4,44 a 4,52, 5,27, 6,15 a 6,21, 6,57, 7,10 a 7,20, 7,72 a 7,80, 8,27 a 8,33 e 10,47 a 11,12. 400 uL de solução de lipídio a 2 mM e 800 uL de solução de TNS a 0,3 mM são misturados.

[000540] Usando o manipulador de líquido de alta produtividade Tecan Genesis RSP150 e *Software* Gemini, 7,5 uL de mistura de sonda/lipídio são adicionados a 242,5 uL de tampão em uma placa de 96 cavidades de 1 mL (modelo NUNC 260252, Nalgae Nunc International). Isto é feito com todos os oito tampões.

[000541] Após mistura em placa de 96 cavidades de 1 mL, 100 uL de cada mistura de sonda/lipídio/tampão são transferidos para uma placa de 96 cavidades de 250 uL preta com base clara (modelo COSTAR 3904, Corning).

[000542] As avaliações de fluorescência são realizadas no espectrofotômetro SpectraMax M5 usando o *software* SoftMax pro 5.2 e seguintes parâmetros:

Modo de leitura: Fluorescência, Leitura de topo

Comprimentos de onda: Ex 322 nm, Em 431 nm, Auto
Corte em 420 nm

Sensibilidade: Leituras 6, PMT: Auto

Automistura: Antes: Desligado

Autocalibragem: Ligada

Tipo de placa de ensaio: *clrbtm* padrão de 96 cavidades

Cavidades para leitura: Leitura de placa inteira

Tempo de sedimentação: Desligada

Coluna Wav. Prioridade: Prioridade de Coluna

Velocidade de transporte: Normal

Autoleitura: Desligada

[000543] Após a medição, o valor de fluorescência de base de uma cavidade vazia na placa de 96 cavidades é subtraído de cada mistura de sonda/lipídio/tampão. Os valores de intensidade de fluorescência são em seguida normalizados para o valor em pH mais baixo. O gráfico de intensidade de fluorescência normalizada vs. pH é em seguida plotado no *software* Microsoft. Os oitos pontos são conectados com uma linha plana.

[000544] O ponto na linha em que a intensidade de fluorescência normalizada é igual a 0,5 é encontrado. O pH correspondendo à intensidade de fluorescência normalizada igual a 0,5 é encontrado e é considerado o pKa do lipídio.

[000545] O pKa determinado usando este método é preciso a cerca de unidades de 0,2 pKa.

Grupos ausentes

[000546] Quando o grupo a, b ou C na Fórmula (I) é “ausente”, que significa que uma ligação simples está presente em vez disto, isto é, que os dois grupos ao lado de grupo a, b ou C são diretamente ligados um ao outro.

Substituição

[000547] Como usado aqui, o termo “opcionalmente substituído” como aplicado a qualquer um dos grupos arila, heteroarila, cicloalquila ou heterociclila, a menos que de outro modo especificado, se refere a um grupo que é não substituído ou é substituído por um ou mais, tipicamente 1, 2, 3, 4 ou 5 substituintes de não hidrogênio adequados, cada qual é independentemente selecionado do grupo que consiste

em:

- (a) alquila;
- (b) hidróxi (ou hidróxi protegido);
- (c) halo;
- (d) oxo, isto é, =O ou alquilimino, isto é, =N-alquila;
- (e) amino, alquilamino ou dialquilamino;
- (f) alcóxi;
- (g) cicloalquila;
- (h) carboxila;
- (i) heterociclo-óxi, em que heterociclo-óxi significa um grupo heterocíclico ligado através de uma ponte de oxigênio;
- (j) alquil-O-C(O)-;
- (k) mercapto;
- (l) nitro;
- (m) ciano;
- (n) sulfamóila ou sulfonamido;
- (o) arila;
- (p) alquil-C(O)-O-;
- (q) aril-C(O)-O-;
- (r) aril-S-;
- (s) arilóxi;
- (t) alquil-S-;
- (u) formila, isto é, HC(O)-;
- (v) carbamóila;
- (w) aril-alquil-; e
- (x) arila substituída com alquila, cicloalquila, alcóxi, hidróxi, amino, alquil-C(O)-NH-, alquilamino, dialquilamino ou halogênio.

[000548] Como usado aqui, o termo “opcionalmente substituído” como aplicado a qualquer uma alquila ou um grupo contendo uma

alquila, a menos que de outro modo especificado, se refere a um grupo que é não substituído ou é substituído por um ou mais, tipicamente 1, 2 ou 3 substituintes de não hidrogênio adequados, cada do qual é independentemente selecionado de do grupo que consiste em: grupos halo, hidróxi (ou hidróxi protegido) ou alcóxi.

[000549] Grupos dos compostos da invenção (por exemplo, grupos alquila, cicloalquila, alcóxi, alquenila, cicloalquenila, alquinila, alquilenos, alquenileno, heteroalquila, heterocicloalquila, heteroalquenila, heterocicloalquenila, heteroalquinila, heteroalquilenos, heteroalquenileno arila, arilalquila, arilheteroalquila, heteroarila, heteroarilalquila ou heteroarilheteroalquila *etc.*) podem ser substituídos ou não substituídos, em uma modalidade não substituídos. Tipicamente, a substituição envolve a substituição nocional de um átomo de hidrogênio com um grupo substituinte, ou dois átomos de hidrogênio no caso de substituição por =O.

[000550] Onde substituído, será geralmente de 1 a 5 substituintes em cada grupo, em uma modalidade 1 a 3 substituintes, em uma modalidade 1 ou 2 substituintes, em uma modalidade 1 substituinte. Uma modalidade inclui mais do que um substituinte no mesmo átomo, por exemplo, um grupo acetal.

[000551] Em uma modalidade, o substituinte(s) é/são independentemente Sub¹ ou Sub² (em uma modalidade Sub²) em que:

Sub¹ é independentemente Sub¹ é independentemente halogênio, trihalometila, trihaloetila, -NO₂, -CN, -N⁺(R^s)₂O⁻, -CO₂H, -CO₂R^s, -SO₃H, -SOR^s, -SO₂R^s, -SO₃R^s, -OC(=O)OR^s, -C(=O)H, -C(=O)R^s, -OC(=O)R^s, =O, -NR^s₂, -C(=O)NH₂, -C(=O)NR^s₂, -N(R^s)C(=O)OR^s, -N(R^s)C(=O)NR^s₂, -OC(=O)NR^s₂, -N(R^s)C(=O)R^s, -C(=S)NR^s₂, -NR^sC(=S)R^s, -SO₂NR^s₂, -NR^sSO₂R^s, -N(R^s)C(=S)NR^s₂, -N(R^s)SO₂NR^s₂, -R^s ou -Z^sR^s, em que;

Z^s é independentemente O, S ou NR^s;

R^s é independentemente H ou C₁₋₆alquila, C₁₋₆heteroalquila,

(Alq^a)_f-C₃₋₆cicloalquila, (Alq^a)_f-C₃₋₆heterocicloalquila, C₂₋₆alquenila, C₂₋₆heteroalquenila, (Alq^a)_f-C₃₋₆cicloalquenila, (Alq^a)_f-C₃₋₆heterocicloalquenila, C₂₋₆alquinila, C₂₋₆heteroalquinila, (Alq^a)_f-C₆₋₁₄arila, (Alq^a)_f-C₆₋₁₄arila ou (Alq^a)_f-heteroarila (onde heteroarila contém 5 a 13 membros de anel), onde

f é 0 ou 1;

Alq^a é C₁₋₆alquilenos ou C₁₋₆heteroalquilenos; e

R^s é opcionalmente substituído sozinho(em uma modalidade não substituído) por 1 a 3 substituintes Sub²;

Sub² é independentemente halogênio, trihalometila, trihaloetila, -NO₂, -CN, -N⁺(C₁₋₆alquil)₂O⁻, -CO₂H, -CO₂C₁₋₆alquila, -SO₃H, -SOC₁₋₆alquila, -SO₂C₁₋₆alquila, -SO₃C₁₋₆alquila, -OC(=O)OC₁₋₆alquila, -C(=O)H, -C(=O)C₁₋₆alquila, -OC(=O)C₁₋₆alquila, =O, -N(C₁₋₆alquil)₂, -C(=O)NH₂, -C(=O)N(C₁₋₆alquil)₂, -N(C₁₋₆alquil)C(=O)O(C₁₋₆alquil), -N(C₁₋₆alquil)C(=O)N(C₁₋₆alquil)₂, -OC(=O)N(C₁₋₆alquil)₂, -N(C₁₋₆alquil)C(=O)C₁₋₆alquila, -C(=S)N(C₁₋₆alquil)₂, -N(C₁₋₆alquil)C(=S)C₁₋₆alquila, -SO₂N(C₁₋₆alquil)₂, -N(C₁₋₆alquil)SO₂C₁₋₆alquila, -N(C₁₋₆alquil)C(=S)N(C₁₋₆alquil)₂, -N(C₁₋₆alquil)SO₂N(C₁₋₆alquil)₂, -C₁₋₆alquila, -C₁₋₆heteroalquila, -C₃₋₆cicloalquila, -C₃₋₆heterocicloalquila, -C₂₋₆alquenila, -C₂₋₆heteroalquenila, -C₃₋₆cicloalquenila, -C₃₋₆heterocicloalquenila, -C₂₋₆alquinila, -C₂₋₆heteroalquinila, -C₆₋₁₄arila, -C₅₋₁₃heteroarila, -Z^t-C₁₋₆alquila, -Z^t-C₃₋₆cicloalquila, -Z^t-C₂₋₆alquenila, -Z^t-C₃₋₆cicloalquenila, ou -Z^t-C₂₋₆alquilil; e

Z^t é independentemente O, S, NH ou N(C₁₋₆alquil).

[000552] Ao mesmo tempo em que R^s em Sub¹ pode ser opcionalmente substituído por 1 a 3 substituintes Sub², Sub² é não substituído. Entretanto, em uma modalidade, R^s é não substituído.

[000553] Em uma modalidade, R^s é H ou C₁₋₆alquila, opcionalmente substituído por 1 a 3 substituintes Sub².

[000554] Em uma modalidade, Sub² é independentemente halogênio,

trihalometila, trihaloetila, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{N}^+(\text{C}_{1-6}\text{alquil})_2\text{O}^-$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{SOC}_{1-6}\text{alquila}$, $-\text{SO}_2\text{C}_{1-6}\text{alquila}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{H}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{C}_{1-6}\text{alquila}$, $=\text{O}$, $-\text{N}(\text{C}_{1-6}\text{alquil})_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}_{1-6}\text{alquila}$, $-\text{C}_{3-6}\text{cicloalquila}$, $-\text{C}_{3-6}\text{heterocicloalquila}$, $-\text{Z}^t\text{-C}_{1-6}\text{alquila}$ ou $-\text{Z}^t\text{-C}_{3-6}\text{cicloalquila}$.

[000555] Em uma modalidade, onde o grupo substituído é acíclico (por exemplo, alquila, heteroalquila, alquenila *etc.*), Sub^1 não é $-\text{R}^s$ e Sub^2 não é $-\text{C}_{1-6}\text{alquila}$, $-\text{C}_{1-6}\text{heteroalquila}$, $-\text{C}_{2-6}\text{alquenila}$, $-\text{C}_{2-6}\text{heteroalquenila}$, $-\text{C}_{2-6}\text{alquinila}$ ou $-\text{C}_{2-6}\text{heteroalquinila}$.

[000556] Onde um grupo diferente de Sub^2 tem pelo menos 2 posições que podem ser substituídas, o grupo pode ser substituído por ambas as extremidades de uma cadeia alquileno, alquenileno, alquinileno, heteroalquileno, heteroalquenileno ou heteroalquinileno (em uma modalidade contendo 1 a 6 átomos, em uma modalidade 3 a 6 átomos, e em uma modalidade 3 ou 4 átomos) para formar uma porção cíclica. A cadeia é opcionalmente substituída por 1 a 3 Sub^2 substituintes. Em uma modalidade a cadeia é não substituída. Desse modo, os termos “cicloalquila”, “cicloalquenila”, “cicloalquinila”, “heterocicloalquila”, “heterocicloalquenila”, “heterocicloalquinila”, “arila” e “heteroarila” opcionalmente substituída incluem espécies fundidas. Por exemplo, “cicloalquila opcionalmente substituída” inclui uma espécie em que dois anéis cicloalquila são fundidos e “opcionalmente substituído heteroarila” inclui uma espécie em que um anel heterocicloalquila é fundido ao anel aromático (por exemplo, 5,6,7,8-tetra-hidro-1,8-naftiridin-2-ila).

[000557] Onde um grupo diferente de Sub^2 tem um átomo que pode ser substituído duas vezes, tal átomo pode ser substituído por ambas as extremidades de uma cadeia alquileno, alquenileno, alquinileno, heteroalquileno, heteroalquenileno ou heteroalquinileno (em uma modalidade contendo 2 a 8 átomos, em uma modalidade 3 a 6 átomos, e em uma modalidade 4 ou 5 átomos) para formar uma porção cíclica.

A cadeia é opcionalmente substituída por 1 a 3 Sub² substituintes. Em uma modalidade a cadeia é não substituída. Desse modo, os termos opcionalmente substituído “cicloalquila”, “cicloalquenila”, “cicloalquinila”, “heterocicloalquila”, “heterocicloalquenila”, “heterocicloalquinila”, “arila” e “heteroarila” incluem espécies espiro.

[000558] Por meio de clarificação, quando um grupo tem um heteroátomo, um substituinte pode ser ligado ao heteroátomo. Desse modo, por exemplo, “heteroalquila opcionalmente substituída” inclui $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{Sub}^1)-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}(\text{Sub}^1)-\text{NH}-\text{CH}_2-$ e $-\text{CH}(\text{Sub}^1)-\text{N}(\text{Sub}^1)-\text{CH}_2-$ etc.

Termos modificadores

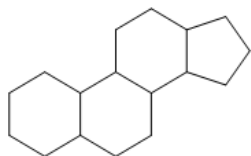
[000559] Quando uma lista é precedida por um modificador, entende-se que o modificador deve ser entendido como aplicando-se a cada um dos itens na lista. Por exemplo, a frase “grupo C₃₋₂₀-heterocicloalquila, C₃₋₂₀-heterocicloalquenila, C₃₋₂₀-heterocicloalquinila ou C₅₋₂₀-heteroarila opcionalmente substituída” significa que cada um dos quatro itens na lista, a saber o grupo C₃₋₂₀-heterocicloalquila, o grupo C₃₋₂₀-heterocicloalquenila, o grupo C₃₋₂₀-heterocicloalquinila e o grupo C₆₋₂₀-heteroarila, podem ser opcionalmente substituídos.

[000560] Quando um grupo é caracterizado por um primeiro modificador e então, mais tarde, o mesmo grupo é caracterizado por um modificador subsequente, que entende-se que o grupo é caracterizado por ambos os modificadores simultaneamente. Por exemplo, se um grupo é descrito como um grupo “C₃₋₂₀-heterocicloalquinila” (o primeiro modificador) e então depois o mesmo grupo é descrito como um grupo “C₅₋₁₆” (o modificador subsequente), o que entende-se que é um grupo C₅₋₁₆ heterocicloalquinila.

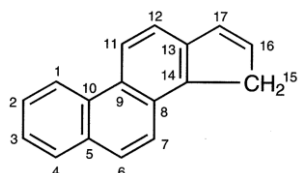
Esteroides

[000561] Como usado aqui, o termo “esteroide” se refere a qualquer grupo compreendendo a seguinte estrutura (cuja estrutura é referida

aqui como o “esqueleto de esteroide”).



[000562] Puramente para os propósitos de ilustração, o esqueleto de esteroide foi representado acima como totalmente saturado. O termo esteroide, entretanto, destina-se também a abranger casos onde existe insaturação no esqueleto de esteroide. Por exemplo, o termo esteroide abrange um grupo que compreende esqueleto básico totalmente insaturado (*mancude*), 15*H*-ciclopenta[*a*]fenantreno:



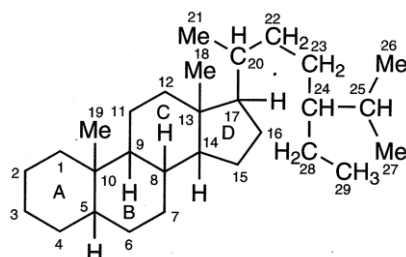
[000563] O termo esteroide também abrange um grupo que compreende um esqueleto de esteroide parcialmente insaturado.

[000564] O termo esteroide também abrange derivados de “seco” do esqueleto de esteroide, isto é, grupos em que a clivagem de anel foi realizada; derivados “*nor*” e “*homo*” do esqueleto de esteroide que envolve a contração e expansão de anel, respectivamente (veja, *Systemic Nomenclature of Organic Chemistry*, por D. Hellwinkel, publicado por Springer, 2001, ISBN: 3-540-41138-0, página 203 para “seco” e página 204 para “*nor*” e “*homo*”). Em uma modalidade, entretanto, tais derivados de “seco” não são abrangidos pelo termo “esteroide”. Em outra modalidade, tais derivados de “*nor*” não são abrangidos pelo termo “esteroide”. Em outra modalidade, tais derivados de “*homo*” não são abrangidos pelo termo “esteroide”. Desse modo, em uma modalidade tais derivados de *seco*, *nor* e *homo* não são abrangidos pelo termo “esteroide”.

[000565] O termo esteroide também abrange casos onde um ou mais dos átomos de carbono no esqueleto de esteroide rotulado por

estrutura é substituído por um heteroátomo. Em uma tal modalidade, até seis átomos de carbono, em uma modalidade até cinco átomos de carbono, em outra modalidade até quatro átomos de carbono, em outra modalidade até três átomos de carbono, em outra modalidade até dois átomos de carbono, em outra modalidade um átomo de carbono, são cada qual substituídos independentemente por O, S(O)_q, N, P(O)_r ou Si (e preferivelmente O, S(O)_q ou N). Em uma modalidade, entretanto, o termo “esteroide” compreende espécie em que o “esqueleto básico de esteroide” não contém heteroátomo.

[000566] Um sistema de anel esteroide é numerado de acordo com a convenção estabelecida abaixo.



[000567] O termo esteroide abrange esteróis, hormônios de esteroide, ácidos de bÍlis e sais de ácidos de bÍlis. Um esteroI é qualquer esteroide com um grupo hidroxila na posição 3 do anel A.

Insaturação

[000568] De acordo com o uso padrão, a posição ômega 3 se refere à terceira ligação da (metil) terminal da cadeia; a posição ômega 6 se refere à sexta ligação da (metil) terminal da cadeia e a posição ômega 9 se refere à nona ligação da (metil) terminal da cadeia.

PDI

[000569] O PDI acrônimo significa índice de polidispersão . A menos que indicado de outro modo, todos os PDIs referidos aqui são o PDI da nanopartícula totalmente formada, quando avaliados por dispersão de luz dinâmica em um Malvern Zetasizer. A amostra de nanopartícula é diluída em salina tamponada por fosfato (PBS) de modo que a taxa de contagem seja de aproximadamente 200 – 400 kcts.

Definições Gerais

[000570] O termo “compreendendo” abrange “incluindo” bem como “que consiste” por exemplo, uma composição “que compreende” X pode consistir exclusivamente de X ou pode incluir qualquer coisa adicional, por exemplo, X + Y.

[000571] A palavra “substancialmente” não exclui “completamente”, por exemplo, uma composição que é “substancialmente livre de Y” pode ser completamente livre de Y. Onde necessário, a palavra “substancialmente” pode ser omitida da definição da invenção.

[000572] O termo “cerca de” com relação a um valor numérico x significa, por exemplo, $x \pm 10\%$. Em uma modalidade, com relação a todos os valores numéricos descritos, o termo “cerca de” é ausente.

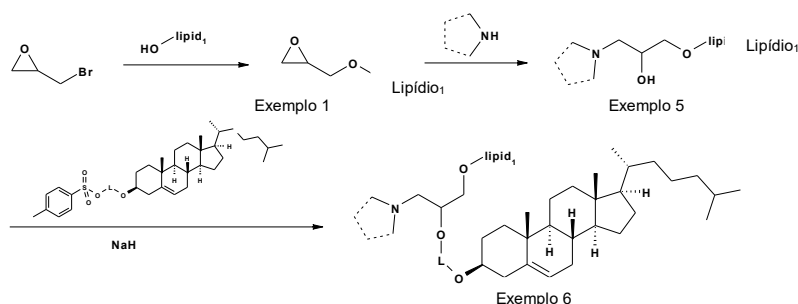
[000573] Para evitar dúvida sobre qualquer característica que é explicitamente descrita no contexto de um composto, composição, método ou uso é também pelo presente implicitamente descrito no contexto de compostos, composições, métodos e usos. Por exemplo, se for aqui explicitamente descrito que um composto inventivo tem característica “A”, então será implicitamente descrito aqui um método de tratamento de acordo com a invenção que envolve o composto da invenção com característica “A”.

[000574] Entretanto, várias modalidades da invenção foram descritas aqui. Será reconhecido que características específicas em cada modalidade podem ser combinadas com outras características para fornecer outras modalidades.

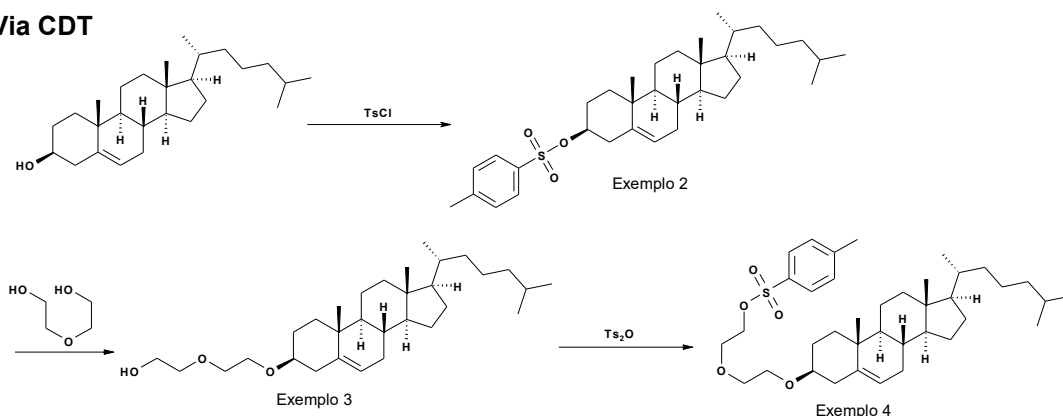
Síntese química de lipídeos catiônicos da invenção

[000575] A via A apresenta um método geral que pode ser usado para sintetizar os compostos da invenção. A via CDT ilustra como o reagente de tosilato de diglicol de colesterol poderia ser preparado.

Via A



Via CDT

Epóxido (Exemplo 1)

[000576] Álcool de linoleíla (48,7 g, 183 mmol) é adicionado a um frasco de fundo redondo e dissolvido em THF (400 mL). A solução resultante é resfriada usando-se um banho de gelo e hidreto de sódio (13,16 g, 329 mmol) é adicionado. A suspensão resultante é agitada durante 1 hora a temperatura ambiente. Epibromoidrina é adicionado em uma porção e a reação continuou a temperatura ambiente. Depois de 4 horas de agitação, hidreto de sódio adicional (13,16 g, 329 mmol) é adicionado. Depois de uma hora de agitação adicional a temperatura ambiente, outra alíquota de epibromoidrina (32,5 g, 238 mmol) é adicionada. A reação é em seguida aquecida durante a noite para 50°C. A reação é em seguida resfriada para a temperatura ambiente e extinguida com água. EtOAc é adicionado e a camada orgânica resultante coletada, lavada com salmoura e secada sobre sulfato de sódio. Os voláteis são removidos através de evaporação rotatória e o resíduo resultante purificado através de cromatografia em sílica em EtOAc / heptanos para produzir o epóxido desejado.

Tosilato de colesterol (Exemplo 2)

[000577] Colesterol (50 g, 129 mmol) é dissolvido em DCM (55 mL) e piridina (150 mL). A solução resultante é resfriada para 0°C e cloreto de tosila é adicionado em uma porção como um sólido. A reação é deixada aquecer lentamente para a temperatura ambiente durante a noite. A reação é concentrada através de evaporação rotatória e MeOH (500 mL) é adicionado para produzir um sólido branco. A agitação é continuada durante 30 minutos e o precipitado coletado através de filtração, lavado com MeOH e secado a vácuo para produzir o tosilato desejado.

Diglicol de colesterol (Exemplo 3)

[000578] Tosilato de colesterol (73 g, 128 mmol) é dissolvido em 1,4-dioxano (750 mL). Dietileno glicol (294 mL, 3077 mmol) é adicionado e a reação é aquecida a um refluxo suave durante a noite. A solução resultante é resfriada para a temperatura ambiente e concentrada através de evaporação rotatória. O gel resultante é absorvido em DCM e agitado com água. A camada orgânica resultante é coletada e a camada aquosa extraída uma vez com DCM. As camadas orgânicas são combinadas, secadas sobre sulfato de sódio, e concentradas através de evaporação rotatória. O produto bruto é purificado sobre sílica em EtOAc / heptano para produzir o diglicol de colesterol desejado.

Tosilato de diglicol de colesterol (Exemplo 4)

[000579] Diglicol de colesterol (51,5 g, 103 mmol) é agitado em DCM (160 mL) e piridina (60 mL). Anidrido de tosila (38,7 g, 119 mmol) é adicionado e a solução resultante é agitada durante a noite a temperatura ambiente. A reação é concentrada através de evaporação rotatória e o resíduo resultante purificado sobre sílica em EtOAc / heptano para produzir o produto desejado.

1-linoleiléter de 3-piperidinil-1,2-propanodiol (Exemplo 5)

[000580] O epóxido do Exemplo 1 (1,0 g, 3,1 mmol) é dissolvido em EtOH (17 mL). Piperidina (0,45 mL, 4,65 mmol) é adicionado e a mistura é aquecida em um reator de micro-ondas para 140°C durante 5 minutos. Após resfriamento para a temperatura ambiente, a mistura é concentrada através de evaporação rotatória e purificada sobre sílica em MeOH / DCM para produzir o álcool de amino desejado.

Composto final 1 (Exemplo 6)

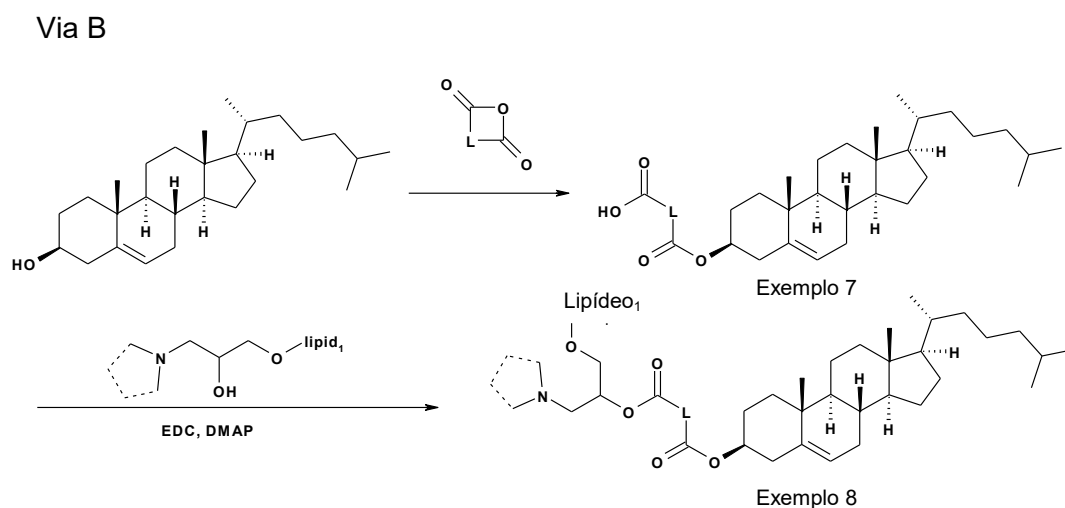
[000581] O álcool de amino do Exemplo 5 (0,447 mg, 1,09 mmol) é agitado em tolueno (15 mL) e NaH (0,102 g, 4,24 mmol) é adicionado em uma porção. A mistura resultante é agitada a temperatura ambiente durante 30 minutos e o tosilato do Exemplo 4 é adicionado em uma porção. A reação é aquecida ao refluxo durante a noite. Após o resfriamento para a temperatura ambiente ("temperatura ambiente"), a reação é extinguida pela adição de bicarbonato de sódio aquoso saturado. A mistura resultante é agitada durante 5 minutos e em seguida concentrada através de evaporação rotatória. O resíduo resultante é purificado diretamente em sílica em MeOH / DCM para produzir um produto bruto que é repurificado sobre sílica em EtOAc / heptano para produzir o composto desejado.

[000582] Os compostos seguintes (cujas estruturas são apresentadas abaixo) podem ser produzidos através da metodologia da Via A.

E0011; E0002; E0003; E0013; E0015;
E0006; E0008; E0001; E0022; E0026;
E0030; E0037; E0038; E0039; E0042;
E0050; E0055; E0061; E0062; E0063;
E0064; E0065; E0066; E0068; E0069;
E0070; E0071; E0072; E0073; E0074;
E0075; E0076; E0077; E0078; E0079;
E0080; E0081; E0082; E0083; E0084;

E0085; E0086; E0087; E0088; E0089;
 E0090; E0091; E0092; E0093; E0094;
 E0095; E0096; E0107; E0109; E0023;
 E0024; E0025; E0031; E0033; E0034;
 E0043; E0046; E0059; E0067; E0014;
 E0119; E0016; E0004; E0005; E0017;
 E0018; E0019; E0120; E0007; E0020;
 E0010; E0021; E0027; E0028; E0029;
 E0032; E0035; E0009; E0040; E0041;
 E0044; E0048; E0049; E0052; E0053;
 E0057; E0119; E0120; E0121; E0124;
 E0126; E0127; E0147; E0149; E0158;
 E0051; E0067; E0112; E0113; E0114;
 E0118; E0159; E0170; e E0171.

[000583] A via B também representa um método geral que pode ser usado para sintetizar os compostos da invenção.



Exemplo 7

[000584] Colesterol (3,33 g, 8,62 mmol), anidrido diglicólico (1 g, 8,62 mmol), DMAP (0,263 g, 2,154 mmol), CH₂Cl₂ (35 ml), e uma barra de agitação são adicionados a um frasco de fundo redondo. A reação é agitada durante três dias a temperatura ambiente.

[000585] A mistura reacional é concentrada, e o resíduo é purificado através de cromatografia *flash* em um IntelliFlash 280 (AnaLogix) usando uma coluna SF40-80G: 0 - 2 CV, 100% de CH₂Cl₂; 2 - 10 CV, gradiente linear de 100:0 de CH₂Cl₂:(MeOH 10%AcOH) a 90:10 de CH₂Cl₂:(MeOH 10% AcOH); 10 - 25 CV, gradiente linear de 90:10 de CH₂Cl₂:(MeOH 10%AcOH) a 85:15 de CH₂Cl₂:(MeOH 10% AcOH). O produto co-elui com colesterol. As frações contendo o produto são combinadas e concentradas a vácuo em uma suspensão branca, em seguida diluídas com heptanos (o colesterol é solúvel em heptanos) e resfriadas em um banho de gelo. O sólido branco é filtrado, lavado com heptanos, e colocado sob vácuo, produzindo 1,50 g (35%) de produto puro.

Exemplo 8

[000586] O álcool de amino do exemplo 5 (105,3 mg, 0,258 mmol), DMAP (22 mg, 0,180 mmol), e o ácido carboxílico do exemplo 7 (135,6 mg, 0,270 mmol) são pesados em um frasco pequeno. Diclorometano (2,5 mL) é adicionado, seguido por EDC.HCl (67,1 mg, 0,350 mmol). A mistura reacional é agitada durante a noite a temperatura ambiente.

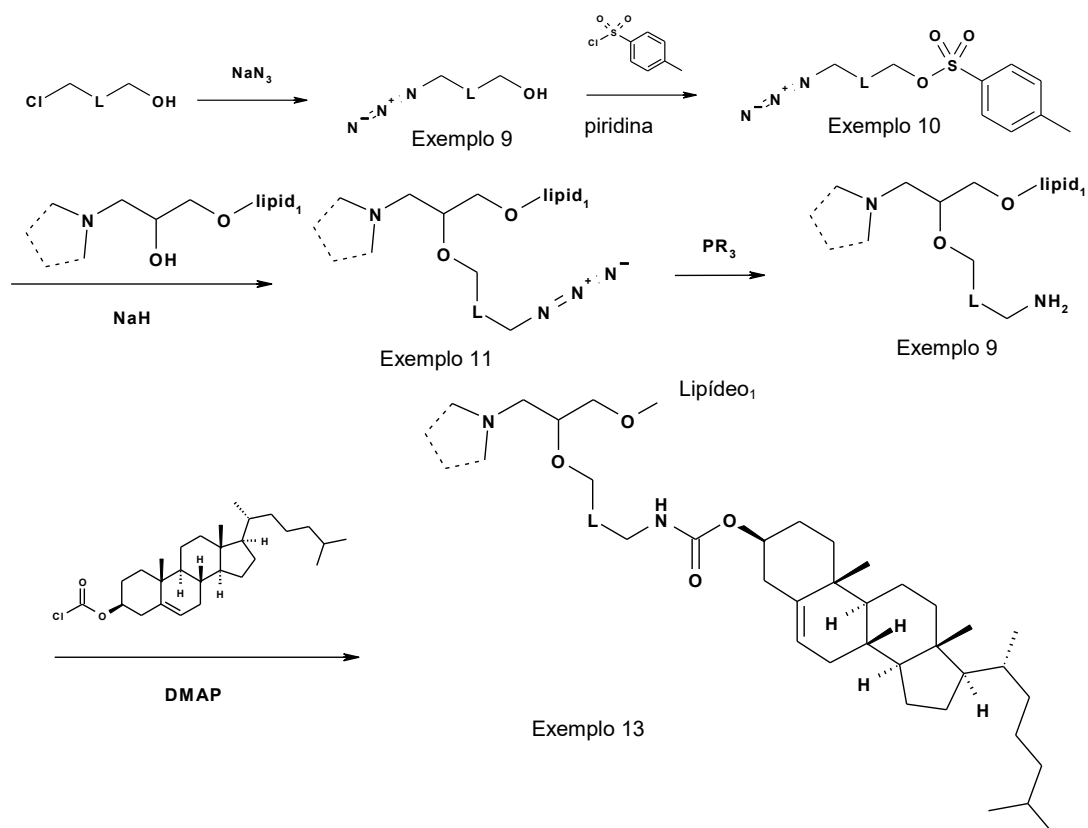
[000587] A mistura reacional bruta é purificada através de cromatografia *flash* em um IntelliFlash 280 (AnaLogix) usando uma coluna SF15-24G: 0 - 3 CV, 100% de CH₂Cl₂; 3 - 25 CV, gradiente linear de 100:0 de CH₂Cl₂:MeOH a 95:5 de CH₂Cl₂:MeOH. O produto ainda está impuro. O resíduo é purificado novamente através de cromatografia *flash* em um IntelliFlash 280 (AnaLogix) usando uma coluna SF15-24G: 0 - 3 CV, 100% de heptanos; 3 - 30 CV, gradiente linear de 100:0 de heptanos:acetato de etila a 65:35 de heptanos:acetato de etila. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas, e concentradas a vácuo para produzir 38 mg (13%) de produto puro como um líquido pálido.

[000588] Os compostos seguintes (cujas estruturas são apresenta-

das abaixo) podem ser produzidos através da metodologia da Via B: E0036 e E0047.

[000589] A via C também representa um método geral que pode ser usado para sintetizar os compostos da invenção.

Via C



Exemplo 9

[000590] 2-(2-Cloroetoxietanol) (5,01 g, 40,2 mmol) é pesado em um frasco de fundo redondo e dissolvido em DMF (100 ml). A solução é agitada, NaN_3 (2,89 g, 44,5 mmol) é adicionado, e a temperatura é aumentada para 80°C . A solução tornou-se turva. A reação é agitada durante a noite.

[000591] Na manhã seguinte, a reação é removida do aquecimento e diluída com 300 mL de água. Esta solução é lavada com acetato de etila para extrair o produto (4 x 100 mL). A fase orgânica é secada com sulfato de sódio e concentrada em um líquido. De acordo com ^1H RMN, este líquido continha DMF a 44% em peso. O produto - 5,19 g

(98%) - é usado na etapa seguinte sem purificação adicional.

Exemplo 10

[000592] O azidoálcool do exemplo 9 (5,25 g, 22,42 mmol) e piridina (3 mL, 37,1 mmol) são dissolvidos em CH₂Cl₂ (45 ml) em um frasco de fundo redondo e agitados em um banho de gelo. Uma vez frios, cloreto de tosila (4,70 g, 24,66 mmol) é adicionado em uma porção. A reação é armazenada em um refrigerador durante a noite.

[000593] No dia seguinte, a reação é diluída com CH₂Cl₂ (50 mL) e extraída com HCl a 1M (2 x 40 mL) para remover a piridina. A fase orgânica é lavada uma vez com salmoura (40 mL) e concentrada. O resíduo é purificado através de cromatografia *flash* em IntelliFlash 280 (AnaLogix) usando-se uma coluna SF40-115G: 0 - 20 CV, gradiente linear de 100:0 de heptanos:acetato de etila a 50:50 de heptanos:acetato de etila. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas, e concentradas a vácuo para produzir o produto com uma pureza estimada de 90%: 0,61 g (10%).

Exemplo 11

[000594] Executado como no exemplo 6, mas usando-se o álcool de amino do exemplo 5 e o tosilato do exemplo 10.

Exemplo 12

[000595] A alquilazida do exemplo 11 (334 mg, 0,641 mmol) é dissolvida em THF (4 mL) e água (0,400 mL) em um frasco pequeno. A esta solução é adicionada uma solução de trimetilfosfina em THF (2,5 mL, 2.500 mmol de trimetilfosfina) e a reação é agitada durante a noite. A reação mostra-se concluída por meio de TLC na manhã seguinte. O solvente é evaporado e o resíduo é dissolvido em 10 mL de MeOH. A solução é carregada em uma coluna de SCX (10g) pré-equilibrada com MeOH, lavada com 50 mL de MeOH, e em seguida elui com 4 x 10 mL de NH₃ a 7M em MeOH. O produto elui nas

segunda, terceira e quarta frações; estas frações são agrupadas e concentradas. Trimetilfosfina ainda está presente de acordo com a TLC (e de acordo com o cheiro), assim o resíduo é absorvido em 50 mL de EtOAc e lavado com 3 x 15 mL de água tornada ligeiramente básica com NaHCO_3 . A fase orgânica é secada com Na_2SO_4 e concentrada em um líquido incolor: 232 mg (73%).

Exemplo 13

[000596] Dissolva a amina do exemplo 12 (232 mg, 0,469 mmol) em CH_2Cl_2 (5 mL) em um frasco de fundo redondo. A esta solução são adicionados cloroformiato de colesterol (316 mg, 0,703 mmol) e DMAP (86 mg, 0,703 mmol). A solução é agitada durante a noite a temperatura ambiente.

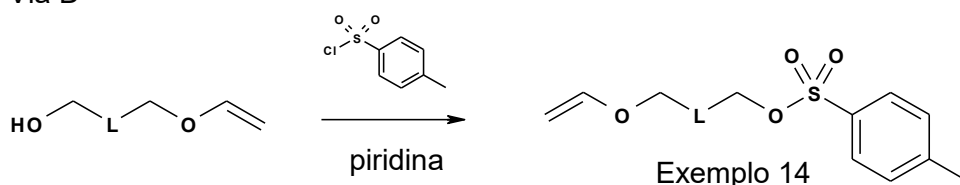
[000597] A mistura reacional bruta é purificada diretamente através de cromatografia *flash* em um IntelliFlash 280 (AnaLogix) usando uma coluna SF15-24G: 0-5 CV, 100% de CH_2Cl_2 ; 5-15 CV, gradiente linear de 100:0 de CH_2Cl_2 :MeOH a 95:5 de CH_2Cl_2 :MeOH; 15-30, 95:5 de CH_2Cl_2 :MeOH. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas, e concentradas em um óleo amarelo-pálido: 339 mg (80%).

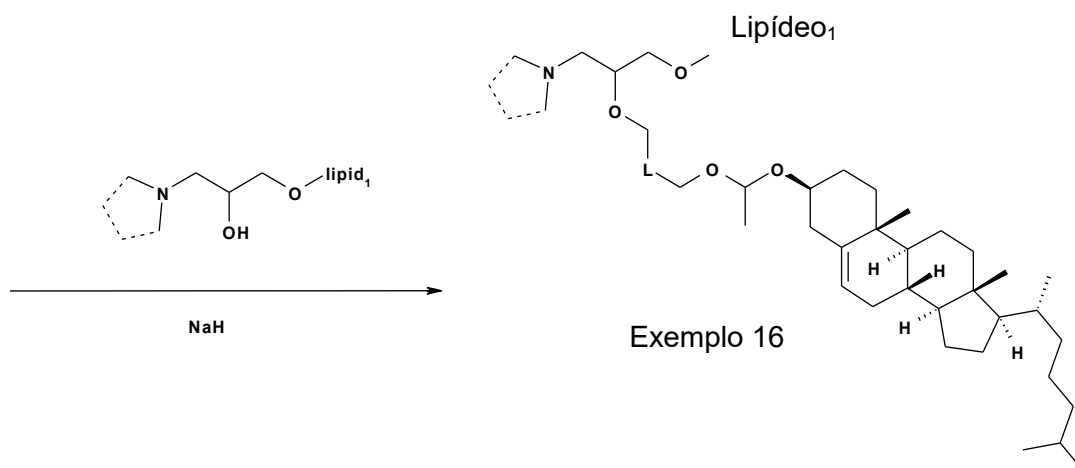
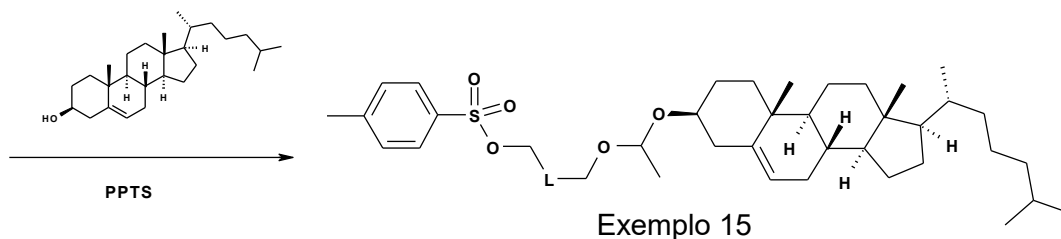
[000598] Os compostos seguintes (cuja estrutura são apresentadas abaixo) podem ser produzidos através da metodologia da Via C:

E0054; E0097; E0099; E0103; E0148;
E0169; E0175; e E0176.

[000599] A via D também representa um método geral que pode ser usado para sintetizar os compostos da invenção.

Via D





Exemplo 14

[000600] A uma solução de éter de vinila de dietileno glicol (3,96 g, 30 mmol) em CH_2Cl_2 a 0°C , piridina (4,85 mL) é adicionado, seguido por cloreto de tosila (6,86 g, 36 mmol). Depois de 10 minutos a 0°C , a reação é aquecida para a temperatura ambiente e agitada durante a noite.

[000601] A reação é extraída entre uma solução aquosa saturada de NaHCO_3 e acetato de etila. Os extratos orgânicos são combinados, secados e concentrados. O resíduo é purificado através de cromatografia *flash* eluindo com 30% de acetato de etila / 70% de heptano: 5,45g (63%).

Exemplo 15

[000602] A uma solução do éter de vinila do exemplo 14 (1,0 g, 3,49 mmol) em CH_2Cl_2 a temperatura ambiente, colesterol (0,675 g, 1,746 mmol) é adicionado, seguido por PPTS (0,878 g, 3,49 mmol). A reação é agitada a temperatura ambiente durante 5 horas. De acordo com TLC, o

produto elui muito próximo ao colesterol e é ligeiramente ativo com UV. A reação é extraída entre uma solução aquosa saturada de NaHCO_3 e acetato de etila. Os extratos orgânicos são combinados, secados e concentrados. O resíduo bruto é purificado através de cromatografia *flash* com 30% de acetato de etila / 70% de heptano: 700 mg (60%).

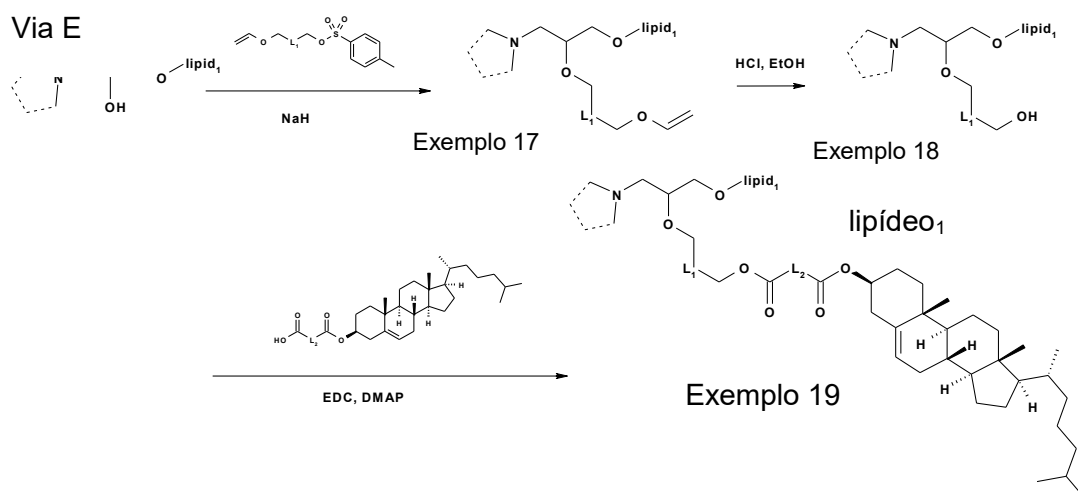
Exemplo 16

[000603] Executado como no exemplo 6 mas usando-se o álcool de amino do exemplo 5 e o tosilato do exemplo 15.

[000604] Os compostos seguintes (cuja estrutura são apresentadas abaixo) podem ser produzidos através da metodologia da Via D: E0058.

[000605] A via E também representa um método geral que pode ser usado para sintetizar os compostos da invenção.

Route E



Exemplo 17

[000606] Executado como no exemplo 6, mas usando-se o álcool de amino do exemplo 5 e o tosilato do exemplo 14.

Exemplo 18

[000607] Uma solução a 1N de HCl aquoso (0,38 mL, 0,38 mmol) é adicionada gota a gota a uma solução do éter de vinila do exemplo 17 (100 mg, 0,19 mmol) em 4 mL de 1:1 de etanol / THF a temperatura ambiente. Depois de 1 hora, a reação é extraída entre uma solução aquosa saturada de NaHCO_3 e acetato de etila. Os extratos orgânicos

são combinados, secados e concentrados em um óleo que é usado na etapa seguinte sem purificação adicional: 85 mg (90%).

Exemplo 19

[000608] Executado como no exemplo 8, mas usando-se o álcool de amino do exemplo 18 e hemissucinato de colesterol como o ácido carboxílico.

[000609] Os compostos seguintes (cujas estruturas são apresentadas abaixo) podem ser produzidos através da metodologia da Via E:

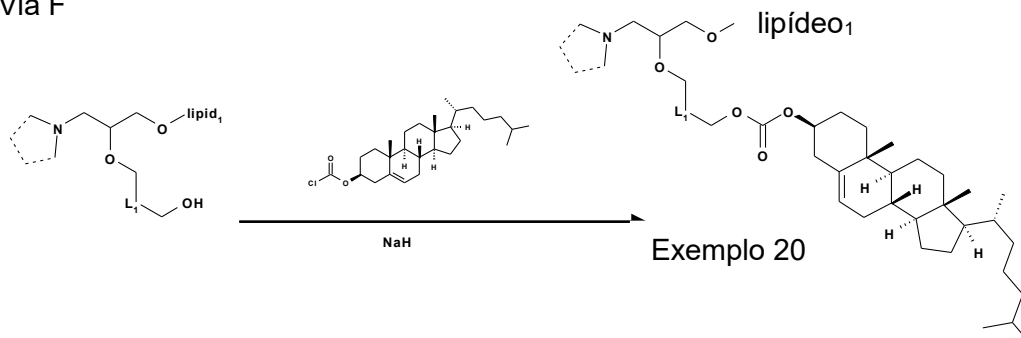
E0060; E0104; E0129; E0130; E0143; E0150;

E0151; E0152; E0161; E0162; E0163; E0164;

E0165; E0177; E0178; e E0179.

[000610] A via F também representa um método geral que pode ser usado para sintetizar os compostos da invenção.

Via F



Exemplo 20

[000611] A uma solução do álcool de amino do exemplo 18 (600 mg, 1,21 mmol) em tolueno (12 mL) a temperatura ambiente, NaH a 60% (97 mg, 2,42 mmol) é adicionado (a reação tornou-se amarela). Depois de 10 minutos, cloroformiato de colesterol (815 mg, 1,815 mmol) é adicionado. A reação é em seguida aquecida a 80°C (a reação tornou-se alaranjada) e agitada durante a noite.

[000612] A mistura reacional é resfriada e extraída entre salmoura e acetato de etila. Os extratos orgânicos são combinados, secados com Na₂SO₄, e concentrados em um óleo. O óleo bruto é purificado através de cromatografia *flash* com 5% de MeOH / 95% de CH₂Cl₂: 720 mg

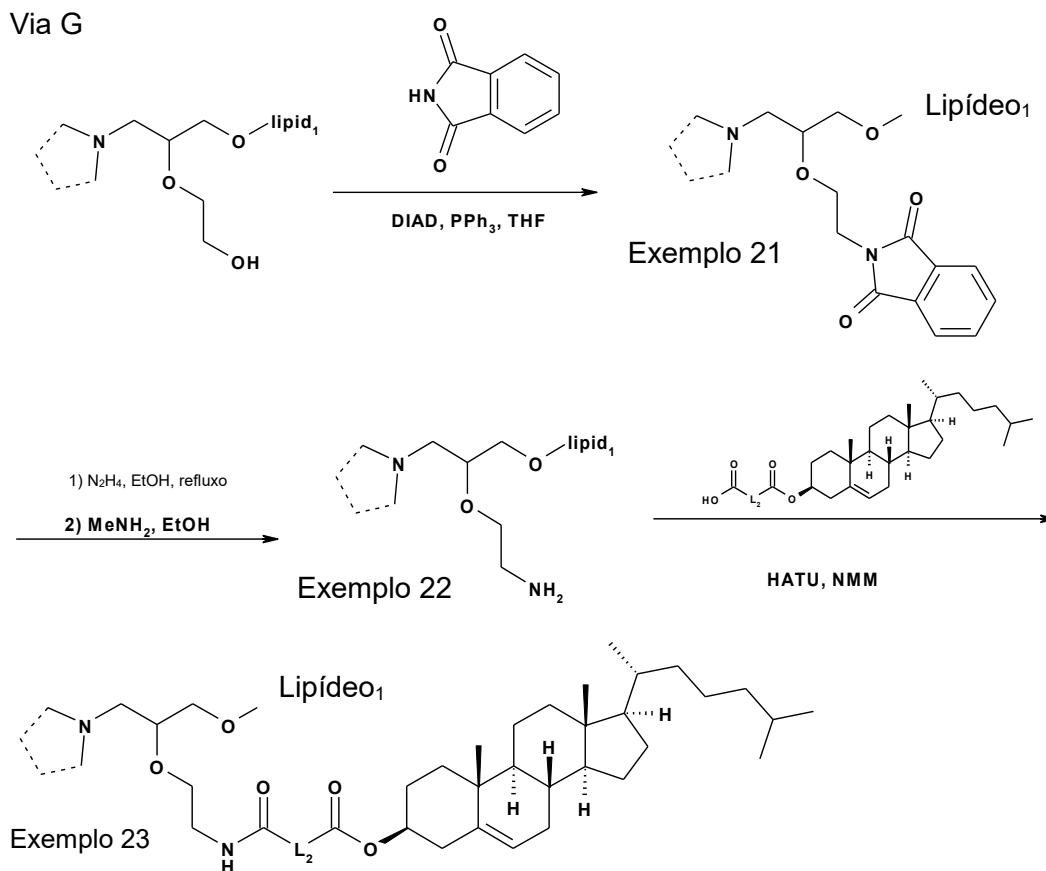
(66%).

[000613] Os compostos seguintes (cujas estruturas são apresentadas abaixo) podem ser produzidos através da metodologia da Via F.

E0056; E0122; E0123; E0138; e E0139.

[000614] A via G também representa um método geral que pode ser usado para sintetizar os compostos da invenção.

Via G



Exemplo 21

[000615] Uma solução do álcool de amino do exemplo 5 (12,4 mmol) em THF (10 mL) e uma solução de DIAD (3 mL) em THF (10 mL) são adicionadas simultaneamente a uma solução de PPh₃ (2,5 g) e ftalimida (2,5 g) em THF (50 mL). A mistura resultante é agitada durante a noite a temperatura ambiente. A reação é concentrada até a secura e usada diretamente na etapa seguinte.

Exemplo 22

[000616] O material do exemplo 21 é agitado em etanol (25 mL) e uma solução de metilamina em THF é adicionada. A reação é agitada a temperatura ambiente durante 16 horas e em seguida concentrada até a secura. O material bruto é purificado através de cromatografia em sílica.

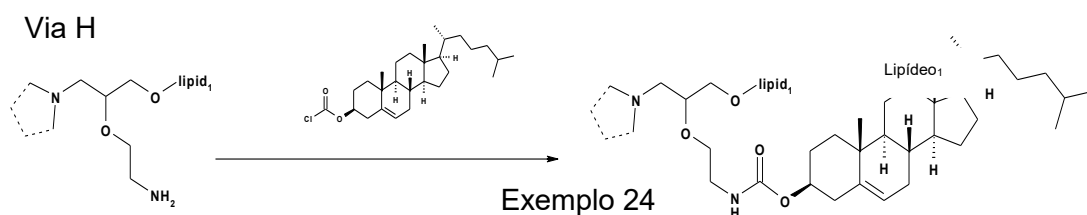
Exemplo 23

[000617] A amina do exemplo 22 (0,22 mmol) é agitada em DMF (5 mL) junto com o hemissucinato de colesterol (0,25 mmol), HATU (0,26 mmol). *N*-metilmorfolina (0,55 mmol) é adicionada e a reação é agitada durante a noite a temperatura ambiente. A solução resultante é concentrada a vácuo e diluída com EtOAc. A camada orgânica resultante é lavada com água e em seguida salmoura e concentrada em um líquido amarelo. O resíduo resultante é purificado em alumina neutra para produzir um líquido amarelo-pálido.

[000618] Os compostos seguintes podem ser produzidos através da metodologia da Via G:

E0098; E0100; E0101; E0105; E0106; e E0108.

[000619] A via H também representa um método geral que pode ser usado para sintetizar os compostos da invenção.



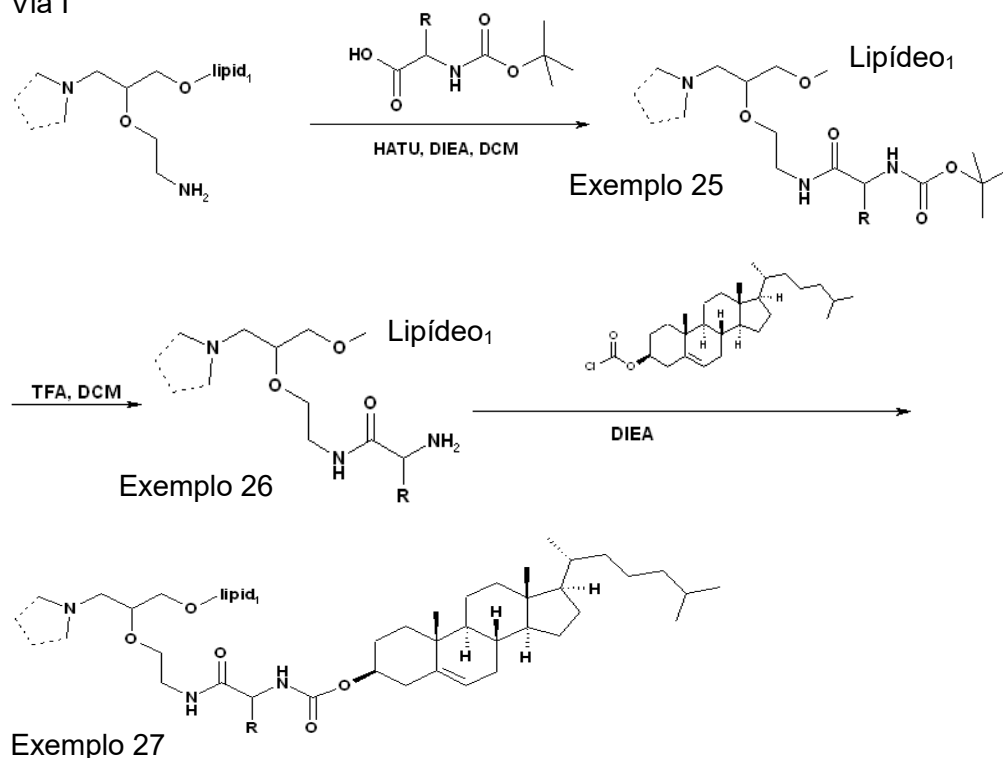
Exemplo 24

[000620] A uma solução da amina do exemplo 22 (3,55 mmol) em DCM (10 mL) é adicionado DIEA (5,7 mmol) e cloroformiato de colesterol (6,0 mmol). A reação resultante é agitada durante a noite a temperatura ambiente. A reação é diluída com EtOAc (50 mL) e lavada com água e em seguida salmoura. A camada orgânica resultante é concentrada em um resíduo e purificada através de cromatografia em sílica para produzir um líquido amarelo-pálido.

[000621] E0102 pode ser preparado usando-se a metodologia da Via H.

[000622] A via I também representa um método geral que pode ser usado para sintetizar os compostos da invenção.

Via I



Exemplo 25

[000623] A uma solução de amina do exemplo 22 (0,33 mmol) em DCM (25 mL) é adicionado glicina de BOC (0,36 mmol), HATU (0,36 mmol) e DIEA (0,66 mmol). A mistura resultante é agitada durante a noite a temperatura ambiente. A mistura reacional resultante é lavada com NH₄Cl aquoso saturado, secada sobre sulfato de sódio e concentrada em um sólido bruto o qual é usado sem purificação adicional.

Exemplo 26

[000624] O material da etapa anterior é agitado em DCM (15 mL) e TFA (5 mL) é adicionado. A solução resultante é agitada durante a noite a temperatura ambiente. A mistura resultante é concentrada até a secar e HCl a 1,5 N (20 mL) é adicionado. A solução é lavada com EtOAc e em seguida reduzida para pH > 7 com NaHCO₃ sólido. A mistura resultante é extraída com DCM e a camada orgânica

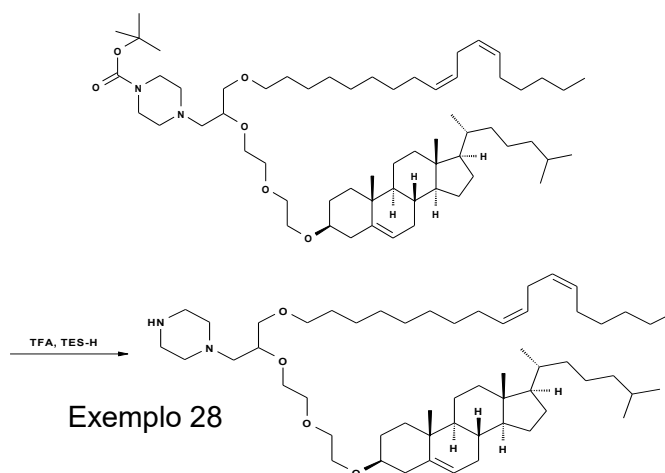
resultante secada sobre sulfato de sódio e concentrada em um sólido bruto o qual é usado sem purificação adicional.

Exemplo 27

[000625] O material da etapa anterior é agitado em DCM (20 mL) e DIEA (0,53 mmol) é adicionado. A esta solução é adicionado cloroformiato de colesterol (0,53 mmol) e a reação é agitada durante a noite a temperatura ambiente. A reação é em seguida diluída com EtOAc (50 mL) e a solução resultante lavada com HCl a 1,5 N, NaHCO₃ aq. a 10%, e salmoura. A camada orgânica resultante é secada sobre sulfato de sódio e concentrada em um sólido.

[000626] E0110 e E0111 podem ser preparados usando-se a metodologia da Via I.

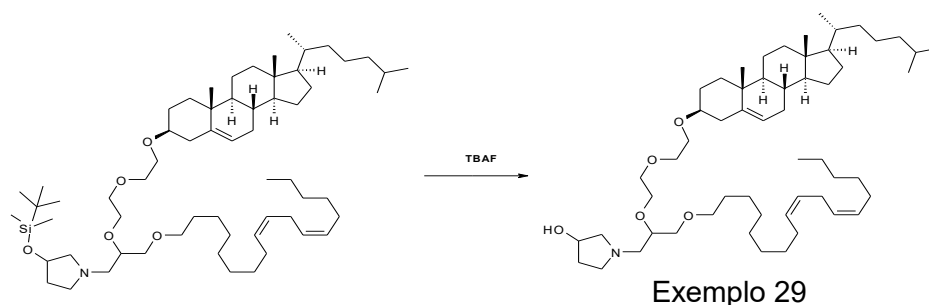
[000627] Os exemplos 28 a 32 também representam vias que podem ser usadas para sintetizar os compostos da invenção.



Exemplo 28

[000628] Lipídeo catiônico protegido por BOC preparado usando-se a metodologia da Via A (150 mg) é agitado com trietilsilano (0,5 mL) e TFA (10 mL) é adicionado em uma porção. Depois de 2 horas, a reação é concentrada até a secar. O resíduo resultante é purificado sobre sílica em MeOH a 0 a 15% em DCM e concentrado em um óleo vítreo.

[000629] E0012 pode ser produzido usando-se este processo.

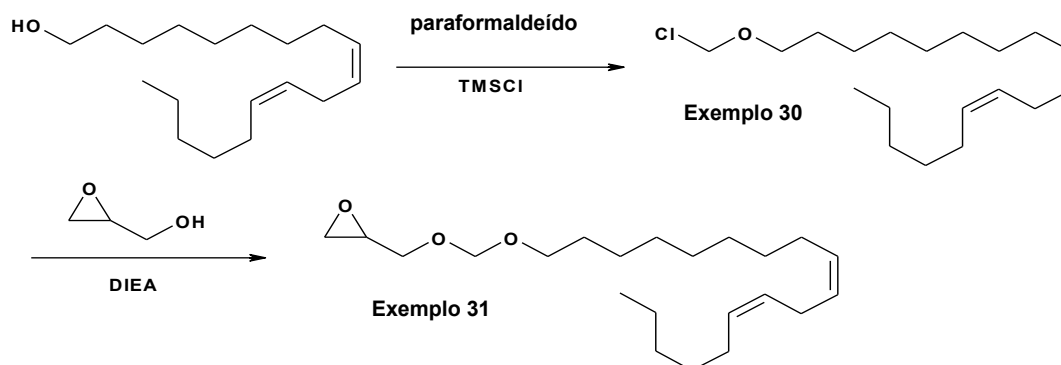


Exemplo 29

[000630] Lipídeo catiônico protegido por TBDMS preparado usando-se a metodologia da Via A (135 mg, 0,138 mmol) é agitado em THF (2 mL) e uma solução de TBAF (0,28 mL, 1,0 M em THF, 0,28 mmol) é adicionada. A reação é agitada durante a noite a temperatura ambiente. A reação é purificada diretamente em sílica em MeOH a 0 a 20% em DCM para produzir um óleo pálido.

[000631] E0045 pode ser produzido usando-se este processo.

[000632] Os exemplos 30 a 31 também representam vias que podem ser usadas para sintetizar os compostos da invenção.



Exemplo 30

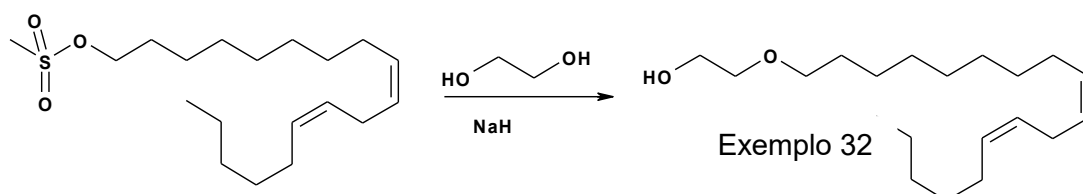
[000633] A uma suspensão agitada de paraformaldeído (536 mg) em TMSCl (9,4 mL) é adicionado álcool de linoleíla (5,0 g) gota a gota durante 15 minutos. Assim que a reação torna-se clara ela é concentrada sob pressão reduzida e usada imediatamente na etapa seguinte.

Exemplo 31

[000634] A uma solução agitada de glicidol (1,5 mL) em THF (50 mL) é adicionado o composto do Exemplo 30 (5,8 g), DIEA (9,5 mL), iodeto

de tetrabutylamônio (6,8 g). A reação é agitada a temperatura ambiente durante 5 horas. Os sólidos são removidos através de filtragem e lavados com éter de dietila. O filtrado é coletado e lavado com água e salmoura. A camada orgânica resultante é secada sobre sulfato de sódio e concentrada sob pressão reduzida em um óleo bruto. O material bruto é purificado através de cromatografia em sílica que foi pré-tratada com fase móvel contendo trietilamina a 3%. O material é eluído usando-se EtOAc em heptanos para produzir 1,65 g de produto puro como um líquido pálido.

[000635] O material de partida para a produção de E0115, E0116, E0117, e E0160 pode ser produzido usando-se etapas do Exemplo 30 e deste Exemplo 31.



Exemplo 32

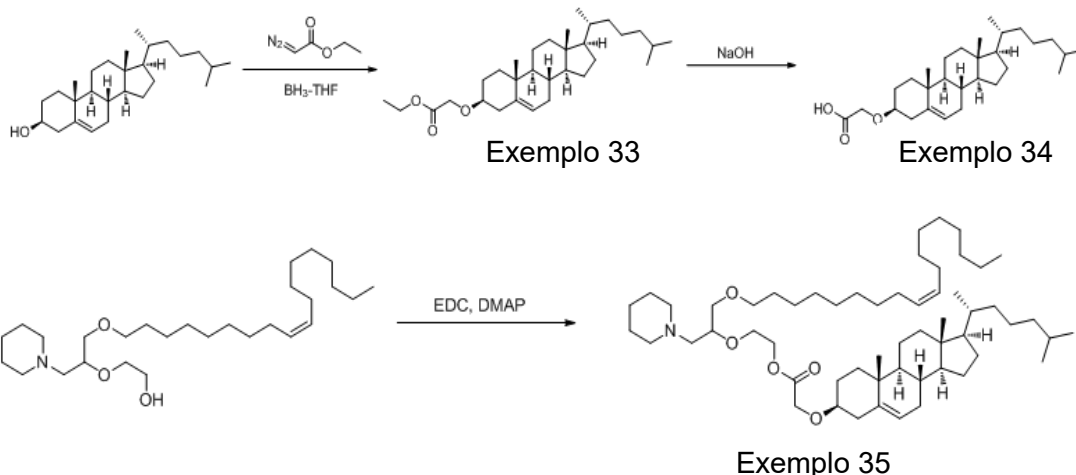
[000636] Etileno glicol (0,30 g) é agitado em THF (20 mL) e hidreto de sódio a 60% em peso é adicionado (0,19 g). A mistura resultante é agitada durante 20 minutos. Mesilato de linoleíla (1,64 g) é adicionado e a reação é aquecida a 50°C durante 2 horas e em seguida ao refluxo durante a noite. A reação é resfriada para a temperatura ambiente e agitada durante umas 24 horas adicionais. À reação é adicionado cloreto de amônio aquoso saturado e a mistura resultante é extraída com DCM. A camada orgânica resultante é secada sobre sulfato de sódio e concentrada em um óleo bruto. O material bruto é purificado sobre sílica usando-se EtOAc em heptanos para produzir 640 mg do produto desejado.

[000637] Os métodos dos exemplos 30 a 32 podem ser usados na síntese de lipídeos (por exemplo E0055) tendo um espaçador entre as

cadeias de linoleíla e o núcleo da molécula.

[000638] A via J também representa um método geral que pode ser usado para sintetizar os compostos da invenção.

Via J



Exemplo 33

[000639] A uma solução de colesterol (10 g, 26 mmol) e borano-THF (5 gotas) em DCM (30 mL) é adicionado etildiazoacetato (3,5 mL, 52 mmol). Após agitação durante 5 minutos, a mistura reacional é concentrada e purificada através de cromatografia em sílica em hexano / EtOAc para produzir 9 g do produto desejado.

Exemplo 34

[000640] A uma solução do composto do Exemplo 33 (9 g, 19 mmol) em EtOH (110 mL) é adicionado NaOH (3 g, 76 mmol). A mistura resultante é aquecida para 70°C durante 3 horas. A reação é resfriada para a temperatura ambiente e concentrada. O resíduo é absorvido em água e acidificado com HCl a 2 N e extraído com DCM (2 x). As camadas orgânicas resultantes são combinadas e concentradas para produzir 8 g do produto desejado.

Exemplo 35

[000641] EDC (1,8 g, 9,8 mmol) e DMAP (80 mg, 0,66 mmol) são adicionados a uma solução do composto do Exemplo 34 (2,2 g, 4,9 mmol) em DCM (5 mL). A reação é agitada durante 10 minutos e em

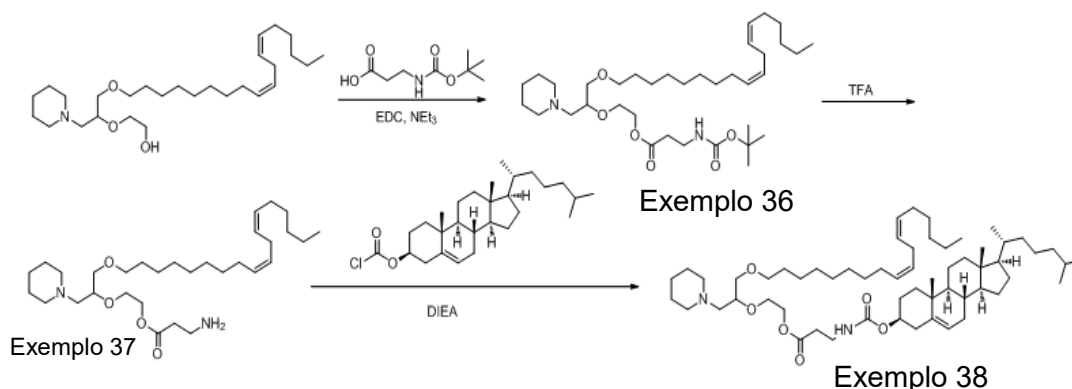
seguida o álcool (1,5 g) é adicionado e a reação é deixada agitar durante a noite a temperatura ambiente. A reação é diluída com DCM e lavada com água. A camada orgânica resultante é concentrada em um resíduo e purificada sobre sílica em clorofórmio / MeOH para produzir o produto desejado como um óleo.

[000642] Os compostos seguintes podem ser produzidos através da metodologia da Via J:

E0125; E0128; E0131; E0140; e E0144.

[000643] A via K também representa um método geral que pode ser usado para sintetizar os compostos da invenção.

Via K



Exemplo 36

[000644] A uma solução de *N*-Boc-beta-alanina (1,25 g, 6,61 mmol) em DCM (6 mL) são adicionados EDC (2,5 g, 13 mmol) HOBt (0,3 g, 2 mmol) e TEA (2 mL, 13 mmol). A mistura resultante é agitada durante 30 minutos. Uma solução do álcool de amino (2 g) em DCM (4 mL) é adicionada e a reação agitada durante 10 horas. A reação é diluída com DCM e lavada com bicarbonato de sódio saturado e salmoura. A camada orgânica resultante é secada sobre sulfato de sódio e concentrada em um óleo que é purificado sobre sílica em MeOH / DCM. O produto é concentrado em 2,65 g de um óleo.

Exemplo 37

[000645] O composto do Exemplo 36 (2,6 g) é agitado em DCM (10 mL) e TFA (10 mL) é adicionado. Depois de 3 horas, a reação é

concentrada até a secar e usada diretamente na etapa seguinte.

Exemplo 38

[000646] A uma solução do composto do Exemplo 37 (2 g) em DCM (20 mL) são adicionados DIEA (2,7 mL, 15,7 mmol) e DMAP (80 mg, 0,6 mmol) seguidos por cloroformiato de colesterol (2,1 g, 4,7 mmol). A reação é agitada durante 3 horas a temperatura ambiente. A reação é diluída com DCM e lavada com água. A camada orgânica resultante é concentrada e purificada sobre sílica em MeOH / clorofórmio para produzir 2,1 g do produto desejado.

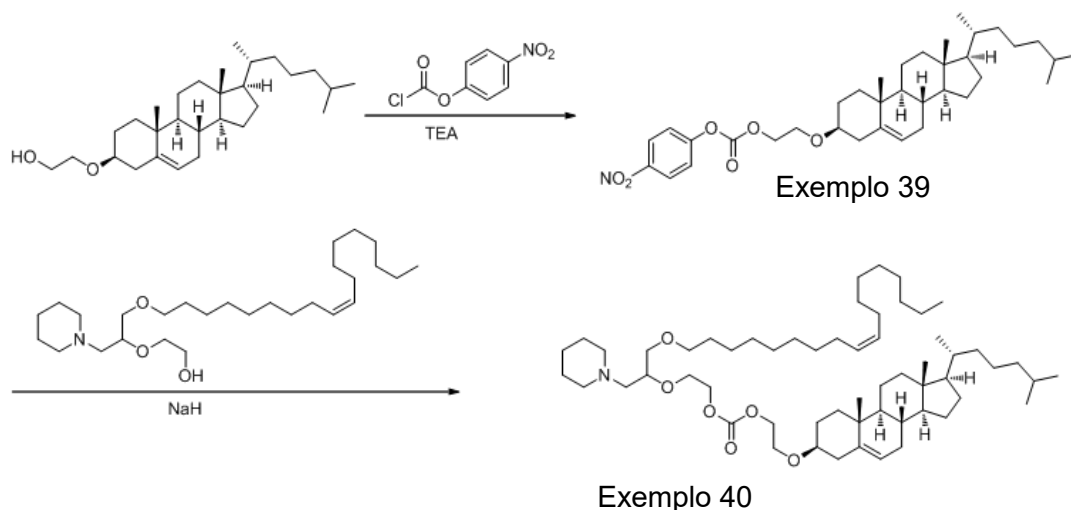
[000647] Os compostos seguintes podem ser produzidos através da metodologia da Via K:

E0133; E0134; E0135; E0136; E0137; E0141;

E0132; E0142; E0145; E0166; e E0168.

[000648] A via L também representa um método geral que pode ser usado para sintetizar os compostos da invenção.

Via L



Exemplo 39

[000649] A uma solução do álcool (2,5 g, 5,8 mmol) em DCM (10 mL) são adicionados p-nitrocloroformiato e TEA. A reação é agitada durante a noite a temperatura ambiente. A reação é diluída com DCM e lavada com água. A camada orgânica resultante é secada sobre sulfato de sódio e concentrada em um óleo e purificada sobre sílica em

EtOAc / hexano para produzir o produto desejado.

Exemplo 40

[000650] O álcool (1,3 g, 2,9 mmol) é agitado em MePh (10 mL). NaH é adicionado (0,46 g, 11,4 mmol) e a reação é agitada a temperatura ambiente durante 30 minutos. O composto do Exemplo 39 (1,7 g, 1,2 mmol) é adicionado e a reação é agitada durante 16 horas a temperatura ambiente. A reação é resfriada em um banho de gelo e extinguida com água. A mistura resultante é extraída com EtOAc. As camadas orgânicas são combinadas, lavadas com salmoura, secadas sobre sulfato de sódio e concentradas em um óleo bruto. O material é purificado sobre sílica em EtOAc / hexano para produzir 1 g do produto desejado.

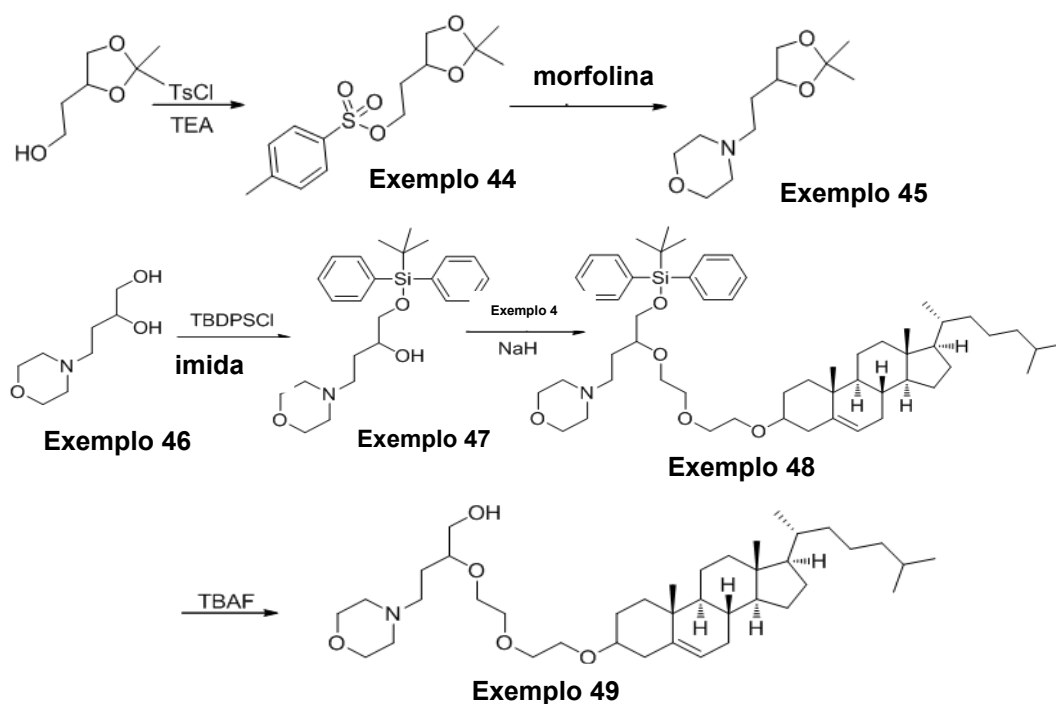
[000651] E0146 pode ser preparado usando-se a tecnologia da Via L.

Exemplos 41, 42 e 43

[000652] Os exemplos 41, 42 e 43 são reservados e são propositadamente deixados em branco.

[000653] A via X também representa um método geral que pode ser usado para sintetizar os compostos da invenção.

Via X



[000654] A uma solução de 2-(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)etanol (800 mg, 5,47 mmol), trietilamina (0,915 mL, 6,57 mmol) e *N,N*-dimetilaminopiridina (134 mg, 1,10 mmol) em diclorometano (25 mL) a temperatura ambiente é adicionado cloreto de tosila (1,10 g, 5,75 mmol). A reação é agitada a temperatura ambiente durante 3 horas. A reação é diluída com NaHCO₃ aquoso saturado, e extraída com acetato de etila. A fase orgânica é secada, concentrada e o produto bruto é purificado através de cromatografia *flash* em sílica com um gradiente de acetato de etila / heptano: 1,24 g, 75%.

[000655] O tosilato do exemplo 44 (1,03 g, 3,43 mmol) e morfolina (2,97 mL, 34,3 mmol) são combinados em um frasco. O frasco é lacrado e aquecido a 60°C durante a noite. A mistura reacional é diluída com etilacetato e lavada com NaHCO₃ aquoso saturado. A fase orgânica é secada, concentrada e o produto bruto é purificado através de cromatografia *flash* em sílica com um gradiente de diclorometano / metanol: 670 mg, 91%.

[000656] A amina do exemplo 45 (530 mg, 2,46 mmol) é dissolvida em dioxano (15 mL) a 0°C. À solução resfriada é adicionado HCl concentrado (aquoso, 7,39 mmol). A reação é agitada durante a noite a temperatura ambiente. K₂CO₃ sólido em excesso é adicionado para neutralizar o ácido. Os sólidos são removidos através de filtração e lavados com acetona. O filtrado é concentrado e o produto bruto é purificado através de cromatografia *flash* em sílica com um gradiente

de diclorometano / metanol: 320 mg, 74%.

Exemplo 47

[000657] O diol da etapa anterior no Exemplo 46 (320 mg, 1,8 mmol) é agitado em DCM (12 mL) com imidazol (249 mg, 3,65 mmol). A esta solução é adicionado TBDPSCI (0,475 mL, 1,8 mmol). A mistura resultante é agitada durante a noite a temperatura ambiente. A reação é diluída com DCM e lavada com bicarbonato de sódio saturado. A camada orgânica resultante é secada sobre sulfato de sódio, concentrada em um óleo e purificada sobre sílica em DCM / MeOH para produzir 650 mg do produto desejado.

Exemplo 48

[000658] Ao material da etapa anterior (640 mg, 1,5 mmol) em tolueno (15 mL) é adicionado hidreto de sódio (124 mg, 60% em peso em óleo, 3,1 mmol). Depois de 20 minutos, o reagente de colesterol (1,17 g, 1,86 mmol) é adicionado e a reação aquecida ao refluxo durante a noite. Após o resfriamento para a temperatura ambiente, a reação é extinguida com salmoura e extraída com acetato de etila. A camada orgânica resultante é secada, concentrada, e purificada sobre sílica em EtOAc / heptanos para produzir 560 mg do produto desejado.

Exemplo 49

[000659] Ao material da etapa anterior (660 mg, 0,76 mmol) em THF (6 mL) é adicionada uma solução a 1M de TBAF em THF (1,5 mL, 1,5 mmol). A reação é agitada a temperatura ambiente durante 2 horas e em seguida diluída com EtOAc. A camada orgânica resultante é lavada com salmoura, secada, e concentrada em um produto bruto que é purificado sobre sílica em MeOH / DCM.

Exemplo 50

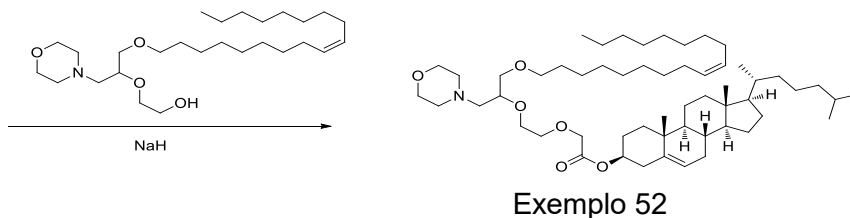
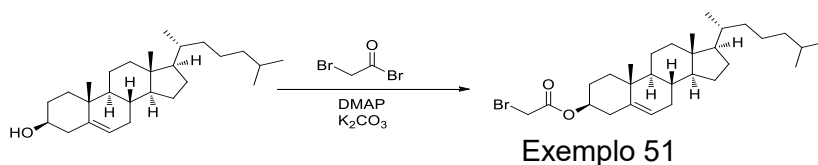
[000660] O álcool de amino do exemplo 49 (280 mg, 0,443 mmol) é dissolvido em tolueno (4 mL) a temperatura ambiente, e em seguida NaH a 60% é adicionado (44 mg, 1,1 mmol). Depois de 20 minutos,

tosilato de oleíla (preparado de álcool de oleíla por um método análogo àquele descrito no exemplo 10) (187 mg, 0,443 mmol) é adicionado. A reação é refluxada durante 3 horas. A reação é resfriada para a temperatura ambiente, diluída com acetato de etila, e lavada com salmoura. A fase orgânica é secada, concentrada e o produto bruto é purificado através de cromatografia *flash* em sílica com um gradiente de acetato de etila / heptano: 183 mg, 47%.

[000661] E0180 pode ser preparado pela metodologia da Via X.

[000662] A via Y também representa um método geral que pode ser usado para sintetizar os compostos da invenção.

Via Y



Exemplo 51

[000663] A uma solução de colesterol (700 mg, 1,8 mmol) em DCM (20 mL) são adicionados carbonato de potássio (750 g, 5,4 mmol) e DMAP (22 mg, 0,18 mmol). Brometo de bromoacetila (0,19 mL, 2,2 mmol) é adicionado gota a gota. Após agitação durante 90 minutos em um banho de gelo, a reação é filtrada, concentrada e purificada sobre sílica em DCM / heptano para produzir 850 mg do produto desejado.

Exemplo 52

[000664] A uma solução do álcool de amino (1,08 g, 2,37 mmol) em MePh (20 mL) é adicionado NaH (190 mg, 60% em peso em óleo, 4,74 mmol). A mistura é aquecida ao refluxo durante 10

minutos e em seguida o colesterol de bromoacetila (1,20 g, 2,37 mmol) é adicionado. A reação é agitada durante 2 horas ao refluxo e em seguida resfriada para a temperatura ambiente. À reação são adicionados água e EtOAc e salmoura. A camada orgânica resultante é coletada, secada, e concentrada em um material bruto que é purificado sobre sílica em EtOAc / heptano depois que a coluna é equilibrada com ácido acético a 1% em DCM. Após a purificação, as frações que contêm produto são combinadas e lavadas com bicarbonato de sódio aquoso saturado antes da concentração em 700 mg do produto desejado.

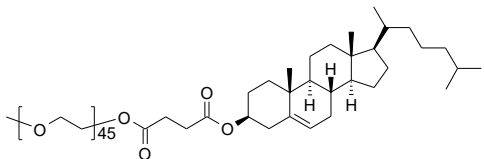
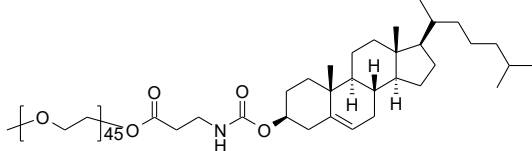
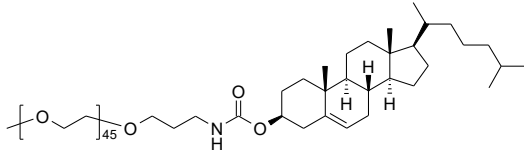
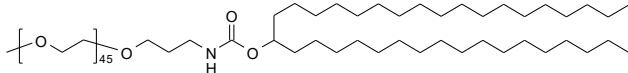
[000665] E0167 pode ser preparado usando-se a metodologia da via Y.

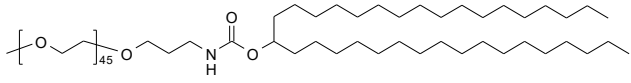
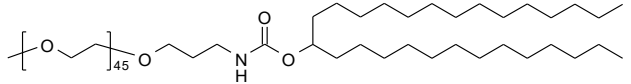
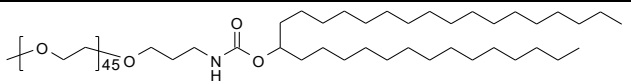
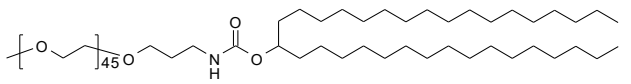
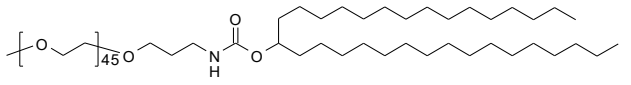
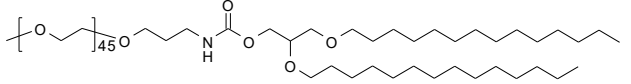
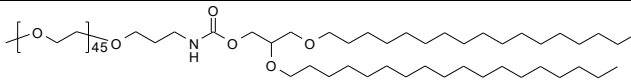
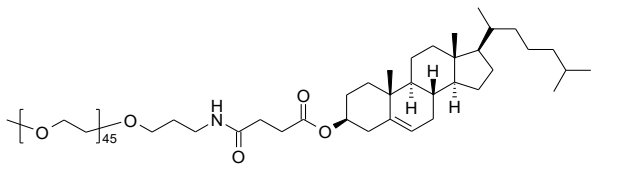
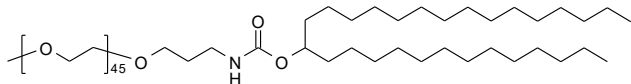
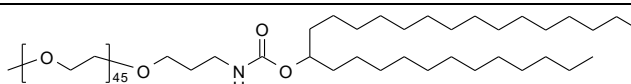
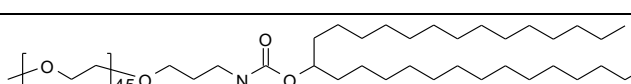
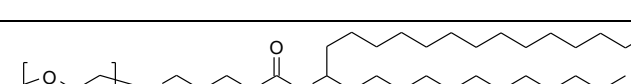
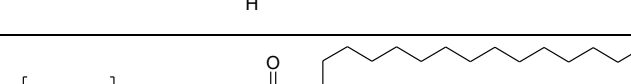
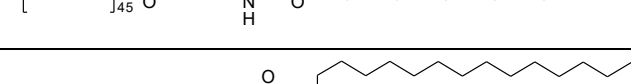
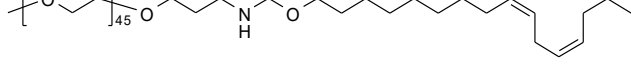
Exemplo 53

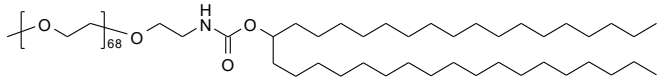
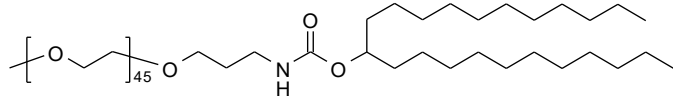
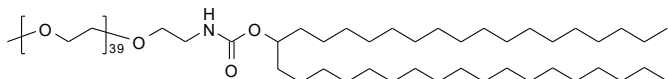
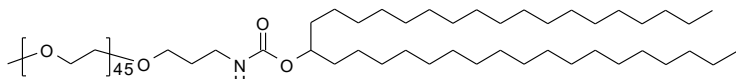
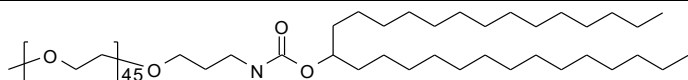
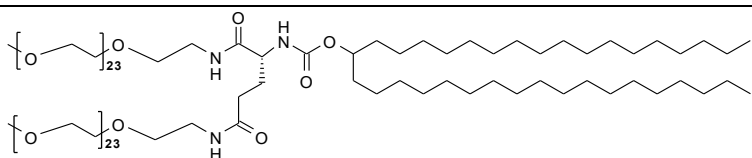
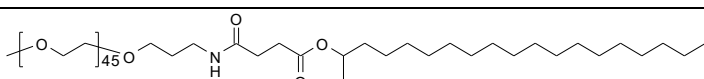
Estruturas e sínteses de lipídeos furtivos

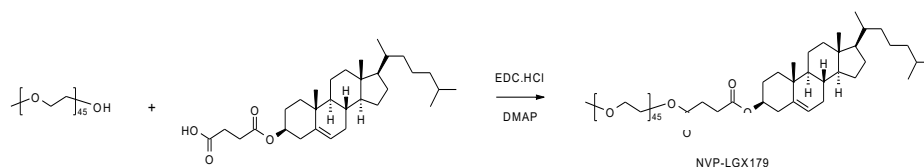
[000666] As estruturas dos lipídeos furtivos S001 a S026 são fornecidas na Tabela 3. Os exemplos 54 a 67 seguintes ilustram a síntese de lipídeos furtivos.

Tabela 3 - Estruturas de lipídeos furtivos

Lipídeo Furtivo	Lipídeo
S001	
S002	
S003	
S004	

S005	
S006	
S007	
S008	
S009	
S010	
S011	
S012	
S013	
S014	
S015	
S016	
S017	
S018	
S019	

S020	
S021	
S022	
S023	
S024	
S025	
S026	

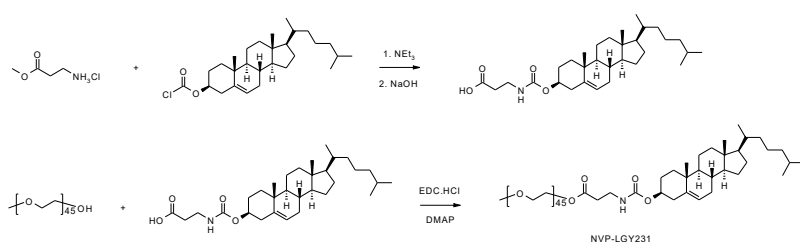
Exemplo 54: S001

[000667] Hemissucinato de colesterol (608 mg, 1,25 mmol) e cloridrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (240 mg, 1,25 mmol, EDC.HCl) são dissolvidos em diclorometano anidroso (4 mL), e em seguida *N,N*-dimetilaminopiridina (305 mg, 2,50 mmol) e éter de metila de poli(etileno glicol) (500 mg, 0,250 mmol, $M_n \sim 2.000$ g/mol, Sigma Aldrich) são adicionados. A mistura reacional é agitada a temperatura ambiente. Após 72 horas, a mistura reacional inteira é carregada em uma coluna de SCX Bond Elut de 10 g (de Varian; pré-equilibrada com 50:50 de diclorometano : metanol) e elui com 50:50 de diclorometano : metanol. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas, e concentradas. O produto bruto também é purificado através de cromatografia *flash* em sílica

com um gradiente de diclorometano / metanol. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas e concentradas em um sólido branco: 304 mg, 48,6%.

[000668] A cromatografia de exclusão por tamanho em tetra-hidrofurano mostra um único pico reduzido. Os picos e valores integrais observados no espectro de ^1H RMN são consistentes com o produto esperado.

Exemplo 55: S002



Etapa 1

[000669] Cloridrato de β -alanina (1,00 g, 7,16 mmol), formiato de colesterol (3,06 g, 6,81 mmol) e trietilamina (2,0 ml, 14 mmol) são dissolvidos em clorofórmio anidro (25 ml). A solução é agitada durante a noite a temperatura ambiente. Na manhã seguinte, o solvente é evaporado e o resíduo é dissolvido em acetato de etila (100 mL) e lavado com HCl a 1 M, salmoura, e secado com Na_2SO_4 . O produto é concentrado em um sólido branco e usado na etapa seguinte sem purificação adicional: 3,31 g, 90,0%.

Etapa 2

[000670] O produto (éster de metila) da etapa anterior (298 mg, 0,578 mmol) é dissolvido em tetra-hidrofurano (2 mL) e NaOH a 1 M (2,0 mL, 2,0 mmol) é adicionado, resultando em uma solução bifásica. A solução é agitada a temperatura ambiente, formando uma emulsão. Depois de 2 horas, a mistura reacional é diluída com 10 mL de água e acidificada com HCl a 1 M. O produto é extraído em acetato de etila (100 mL). A fase orgânica é lavada com salmoura, secada com Na_2SO_4 , e concentrada em um sólido branco. ^1H RMN indicou a

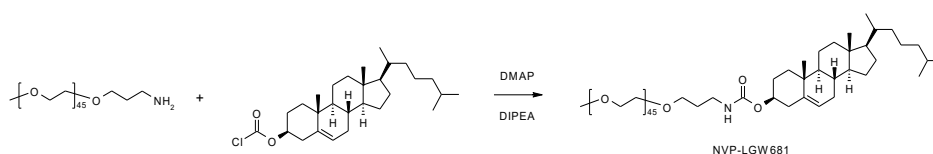
presença de uma pequena quantidade de material de partida de éster de metila (~5% em mol) mas que é considerado suficientemente puro para uso na etapa seguinte sem purificação adicional: 252 mg, 83,0%.

Etapa 3

[000671] Cloridrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (96 mg, 0,50 mmol), o produto (ácido carboxílico) da etapa anterior (252 mg, 0,477 mmol), *N,N*-dimetilaminopiridina (122 mg, 1,00 mmol) e éter de metila de poli(etileno glicol) (200 mg, 0,100 mmol, $M_n \sim 2.000$ g/mol, Sigma Aldrich) são dissolvidos em diclorometano anidroso (5,0 mL) e agitados a temperatura ambiente. Depois de 24 horas, a mistura reacional é carregada em uma coluna de SCX Bond Elut de 10 g (de Varian; pré-equilibrada com 50:50 de diclorometano : metanol) e elui com 50:50 de diclorometano : metanol. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas, e concentradas. O produto bruto também é purificado através de cromatografia *flash* em sílica com um gradiente de diclorometano / metanol. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas e concentradas em um sólido branco: 151 mg, 60,3%.

[000672] A cromatografia de exclusão por tamanho em tetra-hidrofurano mostra um único pico reduzido. Os picos e valores integrais observados no espectro de ^1H RMN são consistentes com o produto esperado.

Exemplo 56: S003

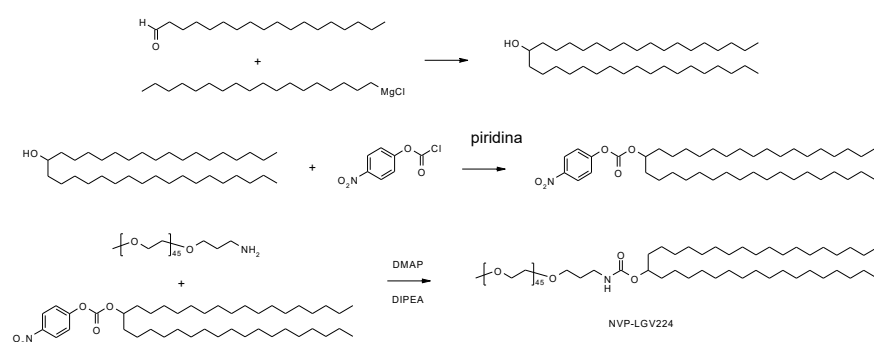


[000673] PEG-NH₂ (500 mg, 0,250 mmol, $M_n \sim 2000$ g/mol, “Sunbright MEPA-20H”, NOF Corp.), cloroformiato de colesterol (449 mg, 1,00 mmol), *N,N*-dimetilaminopiridina (122 mg, 1,00 mmol), e *N,N*-diisopropiletilamina (148 mg, 1,15 mmol) são dissolvidos em 5 mL de

1:1 de tolueno:diclorometano e agitados a temperatura ambiente. Depois de 72 horas, *N,N*-dimetiletilenodiamina (0,2 mL) é adicionado para extinguir cloroformato de colesterol excessivo. Após agitação de 30 minutos, a mistura reacional é carregada em uma coluna de SCX Bond Elut de 10 g (de Varian; pré-equilibrada com 50:50 de diclorometano : metanol) e elui com 50:50 de diclorometano : metanol. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas, e concentradas. O produto bruto também é purificado através de cromatografia *flash* em sílica com um gradiente de diclorometano / metanol. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas e concentradas em um sólido branco: 376 mg, 57,8%.

[000674] A cromatografia de exclusão por tamanho em tetra-hidrofurano mostra um único pico reduzido. Os picos e valores integrais observados no espectro de ^1H RMN são consistentes com o produto esperado.

Exemplo 57: S004



Etapas 1

[000675] A um frasco de fundo redondo secado com pistola térmica e sob nitrogênio são adicionados aldeído de octadecila (500 mg, 1,86 mmol) e tetra-hidrofurano (10 mL). Uma solução de cloreto de magnésio de octadecila a 0,5 M em tetra-hidrofurano (7,5 mL, 3,8 mmol) é adicionada por meio de seringa e a reação é aquecida para 40°C. Quando a adição estiver concluída, a reação é agitada durante 1 hora. A reação é removida do aquecimento e extinguida com 1 mL de

ácido acético. Depois de atingir a temperatura ambiente, a solução é diluída com diclorometano e lavada com água, NaOH a 0,1 M, HCl a 1 M, e salmoura. A fase orgânica é secada com sulfato de sódio e filtrada. O material bruto é cristalizado duas vezes a partir de heptano quente, produzindo o produto como um pó branco: 195 mg, 20,0%.

Etapa 2

[000676] O produto (álcool) da etapa anterior (194 mg, 0,371 mmol) é dissolvido em diclorometano (4 ml) a 40°C e em seguida piridina (100 µl, 1,24 mmol) e 4-nitrofenilcloroformiato (93 mg, 0,46 mmol) são adicionados. A reação é agitada a 40°C durante a noite e em seguida resfriada para a temperatura ambiente. O produto bruto é purificado através de cromatografia *flash* em sílica com um gradiente de heptano / diclorometano. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas e concentradas em um sólido branco: 219 mg, 86,0%.

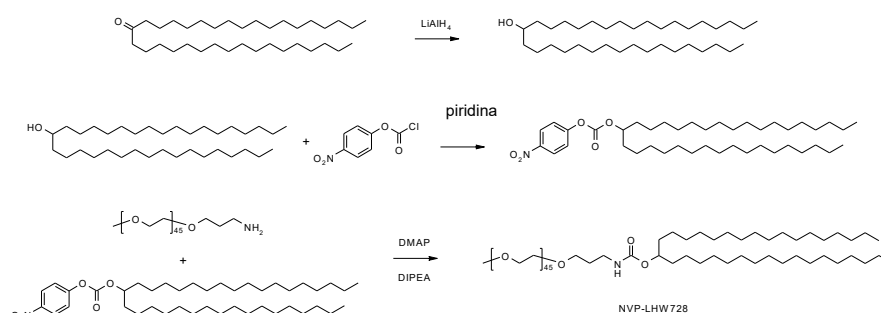
Etapa 3

[000677] O produto (carbonato de 4-nitrofenila) da etapa anterior é dissolvido em tolueno (5 ml) a temperatura ambiente. PEG-NH₂ (800 mg, 0,400 mmol, M_n ~ 2000 g/mol, “Sunbright MEPA-20H”, NOF Corp.), *N,N*-dimetilaminopiridina (50 mg, 0,409 mmol), e *N,N*-diisopropiletilamina (200 µl, 1,145 mmol) são adicionados e a solução é agitada a temperatura ambiente. Depois de 72 horas, a reação é carregada em uma coluna de SCX Bond Elut de 10 g (de Varian; pré-equilibrada com 50:50 de diclorometano : metanol) e elui com 50:50 de diclorometano : metanol. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas, e concentradas. O produto bruto também é purificado através de cromatografia *flash* em sílica com um gradiente de diclorometano / metanol. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas e concentradas. Para remover impurezas de 4-nitrofenol, o produto é dissolvido em diclorometano (10 mL) e resina de recuperação de Si-Amina de

Silicycle (2,0 g, catálogo número R52030B) é adicionada. A solução é agitada a temperatura ambiente durante 1 hora, filtrada para remover a resina, e concentrada em um sólido amarelo-pálido: 806 mg, 97,0%.

[000678] A cromatografia de exclusão por tamanho em *N,N*-dimetilformamida mostra um único pico reduzido. Os picos e valores integrais observados no espectro de ^1H RMN são consistentes com o produto esperado.

Exemplo 58: S005



Etapa 1

[000679] Em um frasco de fundo redondo, pentatriacontan-18-ona (750 mg, 1,48 mmol) é dissolvido em tetra-hidrofurano (40 mL) com aquecimento suave. Depois que a solução contendo cetona resfriou para a temperatura ambiente, uma solução a 4 M de hidreto de alumínio de lítio em éter de dietila (0,74 mL, 2,96 mmol) é adicionada gota a gota. A reação é agitada durante 30 minutos a temperatura ambiente. Decaidrato de sulfato de sódio sólido é adicionado e a suspensão é agitada durante 20 minutos para extinguir o hidreto de alumínio de lítio excessivo. Os sólidos são filtrados, e o filtrado é diluído com heptano e lavado com HCl a 1 M. A fase orgânica é secada com sulfato de sódio e concentrada em um sólido branco. O produto bruto é suficientemente puro para uso na etapa seguinte sem purificação adicional: 650 mg, 86,0%.

Etapa 2

[000680] A uma solução do produto (álcool) da etapa anterior (200 mg, 0,393 mmol) e piridina (78 mg, 0,98 mmol) em diclorometano (10

mL) a temperatura ambiente é adicionado cloroformiato de 4-nitrofenila (99 mg, 0,49 mmol). A mistura reacional é aquecida para 35°C durante 4 horas. A mistura reacional é em seguida diluída com heptano, extraída com HCl a 1 M, e em seguida bicarbonato de sódio saturado. A fase orgânica é secada com sulfato de sódio, concentrada, e purificada através de cromatografia *flash* em sílica com um gradiente de heptano : acetato de etila. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas, e concentradas em um sólido branco: 200 mg, 76%.

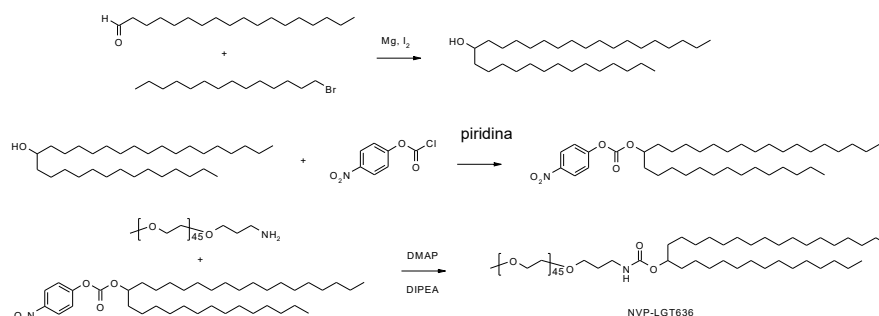
Etapas 3

[000681] O produto (carbonato de 4-nitrofenila) da etapa anterior (260 mg, 0,386 mmol) é dissolvido em tolueno (4 mL), seguido por PEG2k (620 mg, 0,310 mmol, $M_n \sim 2000$ g/mol, “Sunbright MEPA-20H”, NOF Corp.), *N,N*-dimetilaminopiridina (40 mg, 0,33 mmol), e *N,N*-diisopropiletilamina (200 µl, 1,15 mmol). A solução é agitada durante a noite a temperatura ambiente. A mistura reacional é carregada em uma coluna de SCX Bond Elut de 10 g (de Varian; pré-equilibrada com 50:50 de diclorometano : metanol) e elui com 50:50 de diclorometano : metanol. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas, e concentradas. O produto bruto também é purificado através de cromatografia *flash* em sílica com um gradiente de diclorometano / metanol. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas e concentradas. Para remover impurezas de 4-nitrofenol, o produto bruto é dissolvido em 1:1 de diclorometano : metanol e elui através de uma coluna de NH₂ Bond Elut de 10 g (de Varian; pré-equilibrada com 50:50 de diclorometano : metanol). As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas, e concentradas em um sólido amarelo-pálido: 631 mg, 78,0%.

[000682] A cromatografia de exclusão por tamanho em *N,N*-

dimetilformamida mostra um único pico reduzido. Os picos e valores integrais observados no espectro de ^1H RMN são consistentes com o produto esperado.

Exemplo 59: S007



Etapa 1

[000683] A um frasco de fundo redondo são adicionados metal de magnésio (0,201 g, 8,27 mmol) e uma quantidade catalítica de iodo, seguidos por tetra-hidrofurano (30 mL) e 1-bromotetradecano (2,17 g, 7,82 mmol). A mistura é refluxada durante 2 horas e em seguida resfriada para a temperatura ambiente. Uma solução de aldeído de octadecila (0,600 g, 2,24 mmol) em tetra-hidrofurano (5 mL) é adicionada, e a mistura reacional é agitada durante 30 minutos a temperatura ambiente. A reação é diluída com acetato de etila, lavada com HCl a 1 M, secada com sulfato de sódio e concentrada. O produto bruto também é purificado através de cromatografia *flash* em sílica com um gradiente de heptano / acetato de etila. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas e concentradas: 310 mg, 29,7%.

Etapa 2

[000684] O produto (álcool) da etapa anterior (310 mg, 0,664 mmol) é dissolvido em diclorometano (15 mL). Piridina (0,134 mL, 1,66 mmol) é em seguida adicionada, seguida por cloroformiato de 4-nitrofenila (167 mg, 0,830 mmol). A reação é agitada durante a noite a temperatura ambiente. A reação é diluída com acetato de etila, lavada com uma solução aquosa saturada de NaHCO₃, secada com sulfato

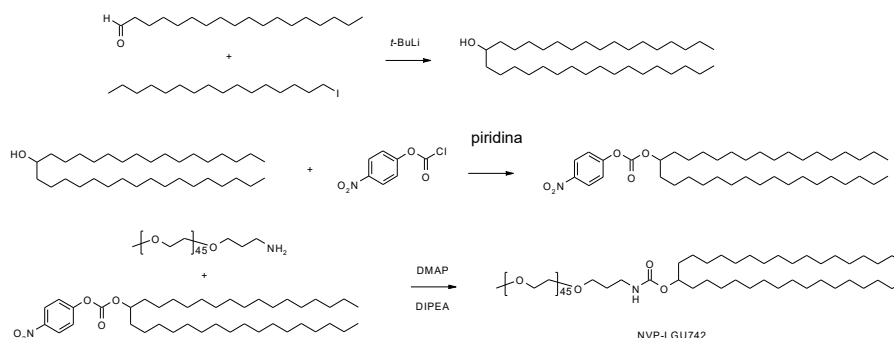
de sódio, e concentrada. O produto bruto também é purificado através de cromatografia *flash* em sílica com um gradiente de heptano / acetato de etila. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas e concentradas: 315 mg, 75,0%.

Etapa 3

[000685] A uma solução do produto (carbonato de 4-nitrofenila) da etapa anterior (315 mg, 0,498 mmol) em tolueno (10 mL) a temperatura ambiente são adicionados *N,N*-dimetilaminopiridina (48,7 mg, 0,399 mmol), e *N,N*-diisopropiletilamina (0,174 mL, 0,997 mmol), seguidos por PEG-NH₂ (798 mg, 0,399 mmol, *M_n* ~ 2000 g/mol, “Sunbright MEPA-20H”, NOF Corp.). A solução amarela é agitada durante a noite a temperatura ambiente. A mistura reacional é carregada em uma coluna de SCX Bond Elut de 10 g (de Varian; pré-equilibrada com 50:50 de diclorometano : metanol) e elui com 50:50 de diclorometano : metanol. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas, e concentradas. O produto bruto também é purificado através de cromatografia *flash* em sílica com um gradiente de diclorometano / metanol. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas e concentradas: 540 mg, 54,3%.

[000686] Os picos e valores integrais observados no espectro de ¹H RMN são consistentes com o produto esperado.

Exemplo 60: S008



Etapa 1

[000687] A um frasco de fundo redondo seco sob nitrogênio são adicionados 1-iodoexadecano (0,705 g, 2,00 mmol) e éter de dietila (15 mL). A solução é resfriada para -78°C (a solução torna-se uma suspensão branca) e uma solução a 1,7 M de *t*-butil lítio em heptano (2,59 mL, 4,40 mmol) é adicionada gota a gota. Após agitação durante 20 minutos, a mistura reacional é aquecida para a temperatura ambiente e agitada durante umas 2 horas adicionais. À mistura reacional é adicionada uma solução de aldeído de octadecila (0,268 g, 1,00 mmol) em éter de dietila (3 mL) gota a gota (exotérmica). A reação é extinguida com HCl a 1 M gelado, extraída com diclorometano, secada com sulfato de sódio, e concentrada. O produto bruto também é purificado através de cromatografia *flash* em sílica com um gradiente de heptano / diclorometano. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas e concentradas: 150 mg, 30,3%.

Etapas 2

[000688] O produto (álcool) da etapa anterior (200 mg, 0,404 mmol) é dissolvido em diclorometano (6 mL). Piridina (0,082 mL, 1,01 mmol) é em seguida adicionada, seguida por cloroformiato de 4-nitrofenila (102 mg, 0,505 mmol). A reação é agitada durante a noite a temperatura ambiente. A reação é diluída com acetato de etila, lavada com uma solução aquosa saturada de NaHCO₃, secada com sulfato de sódio, e concentrada. O produto bruto também é purificado através de cromatografia *flash* em sílica com um gradiente de heptano / acetato de etila. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas e concentradas: 220 mg, 82,0%.

Etapas 3

[000689] A uma solução do produto (carbonato de 4-nitrofenila) da etapa anterior (230 mg, 0,348 mmol) em tolueno (6 mL) a temperatura ambiente são adicionados *N,N*-dimetilaminopiridina (42,6 mg, 0,348

mmol), e *N,N*-diisopropiletilamina (0,152 ml, 0,871 mmol), seguidos por PEG-NH₂ (697 mg, 0,348 mmol, M_n ~ 2000 g/mol, “Sunbright MEPA-20H”, NOF Corp.). A solução amarela é agitada durante a noite a temperatura ambiente. A mistura reacional é carregada em uma coluna de SCX Bond Elut de 10 g (de Varian; pré-equilibrada com 50:50 de diclorometano : metanol) e elui com 50:50 de diclorometano : metanol. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas, e concentradas. O produto bruto também é purificado através de cromatografia *flash* em sílica com um gradiente de diclorometano / metanol. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas e concentradas: 600 mg, 68,3%.

[000690] Os picos e valores integrais observados no espectro de ¹H RMN são consistentes com o produto esperado.

[000691] S009 pode ser preparado de uma maneira análoga àquela descrita para S008.

Exemplo 61: S010 e S011

[000692] S010 e S011 podem ser preparados, por exemplo, tal como fornecidos na publicação de PCT WO2009086558 os compostos IVa e IVc, respectivamente. Estes compostos podem ser sintetizados tal como estabelecido no Exemplo 19 de WO2009086558.

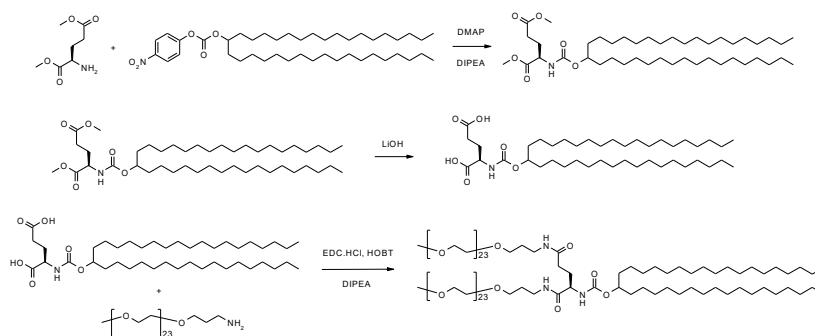
Exemplo 62: S012

[000693] S012 pode ser preparado de uma maneira análoga àquela descrita para S001, utilizando-se PEG-NH₂ (“Sunbright MEPA-20H”, NOF Corp.) em vez de éter de metila de poli(etileno glicol).

Exemplo 63: S006 e S013 a S024

[000694] S006, S013, S014, S015, S016, S017, S018, S019, S020, S021, S022, S023, e S024 podem ser preparados de uma maneira análoga àquela descrita para S004.

Exemplo 64: S025



Etapa 1

[000695] O produto da Etapa 2 na síntese do composto S004 descrito aqui (carbonato de 4-nitrofenila) (285 mg, 0,414 mmol) é suspenso em *N,N*-dimetilformamida (5 mL), seguido por éster de dimetila de ácido D-glutâmico (145 mg, 0,828 mmol), *N,N*-diisopropiletilamina (0,145 ml, 0,828 mmol), e *N,N*-dimetilaminopiridina (101 mg, 0,828 mmol). A solução é aquecida a 60°C durante a noite. A mistura reacional é carregada em uma coluna de SCX Bond Elut de 10 g (de Varian; pré-equilibrada com 50:50 de diclorometano : metanol) e elui com 50:50 de diclorometano : metanol. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas, e concentradas. O produto bruto também é purificado através de cromatografia *flash* em sílica com um gradiente de acetato de etila / heptano. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas e concentradas em um sólido branco: 131 mg, 44%.

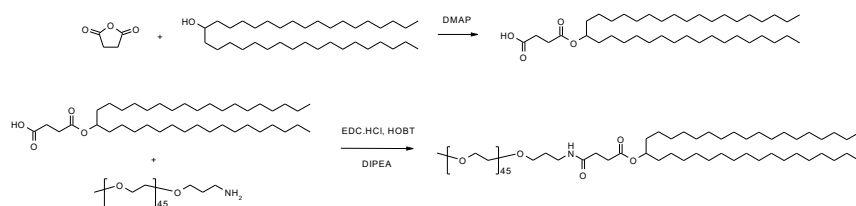
Etapa 2

[000696] O produto da etapa anterior (éster de di-metila) (0,160 g, 0,221 mmol) é dissolvido em tetra-hidrofurano (5 mL), e uma solução de LiOH (52,9 mg, 2,21 mmol) em água (5 mL) é adicionada. A reação é agitada a temperatura ambiente durante 72 horas. A solução é diluída com clorofórmio e lavada com HCl a 1N (aquoso) e em seguida salmoura. A fase orgânica é secada com sulfato de sódio e filtrada. O filtrado é concentrado em um sólido branco: 130 mg, 85%.

Etapa 3

[000697] O produto da etapa anterior (di-ácido) (130 mg, 0,187 mmol) é suspenso em diclorometano (9 mL) e heptano (1,5 mL) a temperatura ambiente. Cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (107 mg, 0,560 mmol) é adicionado à suspensão, seguido por hidroxibenzotriazol (86 mg, 0,56 mmol). Depois de 30 minutos, PEG-NH₂ (411 mg, 0,411 mmol, M_n ~ 1000 g/mol, "mPEG-Amina, 1k", Creative PEGWorks) e *N,N*-diisopropiletilamina (65 µL, 0,374 mmol) são adicionados. A reação é agitada durante a noite a temperatura ambiente. A mistura reacional é carregada em uma coluna de SCX Bond Elut de 10 g (de Varian; pré-equilibrada com 50:50 de diclorometano : metanol) e elui com 50:50 de diclorometano : metanol. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas, e concentradas. O produto bruto também é purificado através de cromatografia *flash* em sílica com um gradiente de diclorometano / metanol. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas e concentradas em um sólido branco: 376 mg, 57,8%.

Exemplo 65: **S026**



Etapa 1

[000698] O produto da Etapa 1 na síntese do composto S004 descrito aqui (álcool) (200 mg, 0,382 mmol), anidrido succínico (38 mg, 0,38 mmol), e *N,N*-dimetilaminopiridina (12 mg, 0,096 mmol) são pesados em um frasco e suspensos em clorofórmio (3,5 mL). A mistura reacional é agitada durante a noite a 70°C. A mistura reacional é carregada em uma coluna de SCX Bond Elut de 1 g (de Varian; pré-equilibrada com diclorometano) e elui com diclorometano. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas, e

concentradas. O produto bruto também é purificado através de cromatografia *flash* em sílica com um gradiente de acetato de etila / heptano. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas e concentradas em um sólido branco: 134 mg, 56%.

Etapa 2

[000699] O produto da etapa anterior (ácido carboxílico) (75 mg, 0,12 mmol), cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (35 mg, 0,18 mmol) e hidroxibenzotriazol (28 mg, 0,18 mmol) são dissolvidos em clorofórmio anidro (1 mL) e agitados durante 0,5 hora a temperatura ambiente. Em seguida PEG-NH₂ (265 mg, 0,132 mmol, M_n ~ 2000 g/mol, "Sunbright MEPA-20H", NOF Corp.) e N,N-diisopropiletilamina (32 µL, 0,18 mmol) são adicionados e a solução é agitada durante a noite a temperatura ambiente. A mistura reacional é carregada em uma coluna de SCX Bond Elut de 2 g (de Varian; pré-equilibrada com 50:50 de diclorometano : metanol) e elui com diclorometano. As frações contendo o produto são identificadas através de TLC, combinadas, e concentradas em um sólido branco: 240 mg, 76%.

[000700] Os dados de caracterização para estes lipídeos furtivos são como a seguir nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - ¹H RMN para os Lipídeos Furtivos S001 a S026

S001	0,68 (s, 3H), 0,78-1,63 (m, 33H), 1,76-1,91 (m, 3H), 1,91-2,07 (m, 2H), 2,32 (d, 2H), 2,56-2,70 (m, 4H), 3,39 (s, 3H), 3,43-3,89 (m, 210H), 4,25 (t, 2H), 4,64 (m, 1H), 5,33-5,41 (m, 1H)
S002	0,67 (s, 3H), 0,77-1,66 (m, 33H), 1,72-2,10 (m, 7H), 2,17-2,44 (m, 2H), 2,57 (t, 2H), 3,38 (s, 3H), 3,41-3,94 (m, 196H), 4,26 (t, 2H), 4,38-4,61 (m, 1H), 5,19-5,30 (m, 1H), 5,34-5,43 (m, 1H)
S003	0,68 (s, 3H), 0,78-1,67 (m, 33H), 1,68-1,92 (m, 5), 1,92-2,07 (m, 2H), 2,15-2,46 (m, 2H), 3,22-3,34 (m, 2H), 3,38 (s, 3H), 3,41-3,90 (m, 200H), 4,40-4,57 (m, 1H), 5,14 (br, 1H), 5,33-5,43 (m, 1H)
S004	0,88 (t, 6H), 1,25 (m, 62H), 1,48 (m, 4H), 1,77 (m, 2H), 3,18-3,34 (m, 2H), 3,38 (s, 3H), 3,42-3,88 (m, 205H), 4,71 (m, 1H), 5,06 (m, 1H)

S005	0,89 (t, 6H), 1,26 (m, 60H), 1,48 (m, 4H), 1,78 (m, 2H), 3,17-3,33 (m, 2H), 3,39 (s, 3H), 3,42-3,88 (m, 203H), 4,71 (m, 1H), 5,07 (m, 1H)
S006	0,88 (t, 6H), 1,25 (m, 46H), 1,48 (m, 4H), 1,77 (m, 2H), 3,14-3,34 (m, 2H), 3,38 (s, 3H), 3,41-3,91 (m, 209H), 4,71 (m, 1H), 5,06 (m, 1H)
S007	0,87 (m, 6H), 1,25 (m, 54H), 1,48 (m, 4H), 1,76 (m, 2H), 3,15-3,32 (m, 2H), 3,37 (s, 3H), 3,41-3,89 (m, 206H), 4,70 (m, 1H), 5,06 (m, 1H)
S008	0,84 (t, 6H), 1,21 (m, 58H), 1,43 (m, 4H), 1,74 (m, 2H), 2,99-3,29 (m, 2H), 3,34 (s, 3H), 3,37-4,08 (m, 187H), 4,66 (m, 1H), 5,08 (m, 1H)
S009	0,88 (t, 6H), 1,25 (m, 54H), 1,47 (m, 4H), 1,77 (m, 2H), 3,16-3,34 (m, 2H), 3,38 (s, 3H), 3,41-3,87 (m, 207H), 4,70 (m, 1H), 5,06 (m, 1H)
S010	0,88 (t, 6H), 1,25 (m, 44H), 1,55 (m, 4H), 1,78 (m, 2H), 3,15-3,33 (m, 2H), 3,38 (s, 3H), 3,40-3,95 (m, 207H), 3,97-4,30 (m, 2H), 4,96-5,27 (br m, 1H)
S011	0,89 (t, 6H), 1,26 (m, 60H), 1,56 (m, 4H), 1,78 (m, 2H), 3,20-3,34 (m, 2H), 3,39 (s, 3H), 3,40-3,89 (m, 219H), 4,02-4,26 (m, 2H), 5,09-5,23 (m, 1H)
S013	0,89 (t, 6H), 1,26 (m, 54H), 1,48 (m, 4H), 1,77 (m, 2H), 3,16-3,34 (m, 2H), 3,38 (s, 3H), 3,41-3,87 (m, 187H), 4,71 (m, 1H), 5,05 (m, 1H)
S014	0,89 (t, 6H), 1,26 (m, 54H), 1,49 (m, 4H), 1,78 (m, 2H), 3,16-3,34 (m, 2H), 3,39 (s, 3H), 3,41-3,87 (m, 210H), 4,72 (m, 1H), 5,05 (m, 1H)
S015	0,89 (t, 6H), 1,26 (m, 50H), 1,48 (m, 4H), 1,78 (m, 2H), 3,16-3,34 (m, 2H), 3,39 (s, 3H), 3,41-3,87 (m, 209H), 4,71 (m, 1H), 5,06 (m, 1H)
S016	0,88 (t, 6H), 1,26 (m, 50H), 1,47 (m, 4H), 1,77 (m, 2H), 3,16-3,34 (m, 2H), 3,38 (s, 3H), 3,41-3,87 (m, 202H), 4,71 (m, 1H), 5,06 (m, 1H)
S017	0,89 (t, 6H), 1,26 (m, 46H), 1,49 (m, 4H), 1,78 (m, 2H), 3,16-3,34 (m, 2H), 3,39 (s, 3H), 3,41-3,87 (m, 203H), 4,71 (m, 1H), 5,06 (m, 1H)
S018	0,88 (t, 6H), 1,25 (m, 48H), 1,48 (m, 4H), 1,77 (m, 2H), 2,05 (m, 4H), 2,77 (m, 2H), 3,16-3,34 (m, 2H), 3,39 (s, 3H), 3,41-3,87 (m, 180H), 4,71 (m, 1H), 5,05 (m, 1H), 5,25-5,50 (m, 4H)
S019	0,88 (t, 6H), 1,26 (m, 54H), 1,48 (m, 4H), 1,77 (m, 2H), 2,01 (m, 4H), 3,16-3,34 (m, 2H), 3,38 (s, 3H), 3,41-3,87 (m, 200H), 4,71 (m, 1H), 5,05 (m, 1H), 5,31-5,49 (m, 2H)
S020	0,88 (t, 6H), 1,26 (m, 62H), 1,49 (m, 4H), 3,38 (s, 3H), 3,4-3,9 (m, 299H), 4,72 (m, 1H), 5,11 (m, 1H)

S021	0,89 (t, 6H), 1,26 (m, 36H), 1,48 (m, 4H), 1,78 (m, 2H), 3,20-3,35 (m, 2H), 3,39 (s, 3H), 3,41-3,87 (m, 196H), 4,71 (m, 1H), 5,07 (m, 1H)
S022	0,89 (t, 6H), 1,26 (m, 62H), 1,49 (m, 4H), 3,36 (s, 3H), 3,41-3,87 (m, 161H), 4,72 (m, 1H), 5,14 (m, 1H)
S023	0,88 (t, 6H), 1,26 (m, 64H), 1,47 (m, 4H), 1,77 (m, 2H), 3,20-3,35 (m, 2H), 3,39 (s, 3H), 3,42-3,88 (m, 194H), 4,71 (m, 1H), 5,06 (m, 1H)
S024	0,88 (t, 6H), 1,25 (m, 48H), 1,47 (m, 4H), 1,77 (m, 2H), 3,20-3,35 (m, 2H), 3,39 (s, 3H), 3,42-3,88 (m, 194H), 4,70 (m, 1H), 5,08 (m, 1H)
S025	0,87 (t, 6H), 1,24 (m, 62H), 1,47 (m, 4H), 2,01 (m, 2H), 2,2-2,4 (m, 2H), 3,36 (s, 3H), 3,41-3,87 (m, 229H), 4,13 (m, 1H), 4,65 (m, 1H), 5,78 (m, 1H), 6,65 (m, 1H), 7,07 (m, 1H)
S026	0,87 (t, 6H), 1,25 (m, 62H), 1,49 (m, 4H), 1,76 (m, 2H), 2,44 (t, J = 8 Hz, 2H), 2,63 (t, J = 8 Hz, 2H), 3,37 (s, 3H), 3,41-3,87 (m, 213H), 4,84 (m, 1H), 6,32 (m, 1H)

Tabela 5 - Outras características para os Lipídeos Furtivos S001 a S026

	SEC	MALDI	TLC	Condições de TLC	Solvente de TLC
S001	único pico (THF)	~2550			
S002	único pico (THF)	~2550			
S003	único pico (THF)	~2600			
S004	único pico (DMF)				
S005	único pico (DMF)				
S006	único pico (DMF)				
S007			0,39	1:9	MeOH:CH ₂ Cl ₂
S008			1,39	1:9	MeOH:CH ₂ Cl ₂
S010	único pico (THF)	~2800			
S011	único pico (DMF)				
S013	único pico (THF)	~2650			
S014	único pico (THF)	~2750			
S015	único pico (THF)	~2750			
S016	único pico (THF)	~2700			
S017	único pico (THF)	~2650			
S018	único pico (THF)	~2750			

	SEC	MALDI	TLC	Condições de TLC	Solvente de TLC
S019	único pico (THF)	~2750			
S020	único pico (THF)	~3600			
S021	único pico (DMF)	~2700			
S022	único pico (DMF)	2364,1 (exato)			
S023		~2900			
S024		~2700			
S025	único pico (THF)	~3000			
S026	único pico (THF)	~3050			

Exemplo 66*Tabela Resumo de Resultados*

[000701] Os compostos sintetizados estão representados nas tabelas seguintes. Para se evitar dúvidas, alguns dos grupos de substituintes foram traçados de tal modo que eles estão sobrepostos, mas a verdadeira estrutura do composto está no entanto perfeitamente clara. Por exemplo, a notação

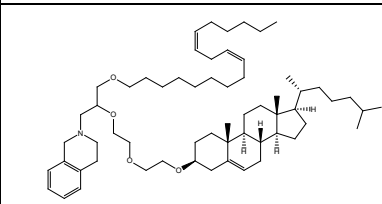
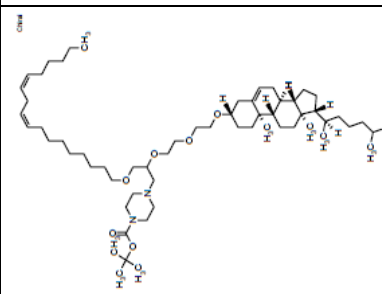
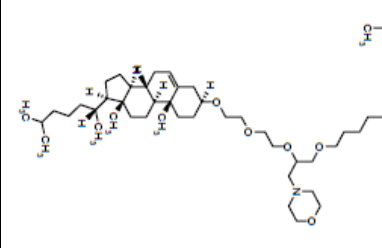
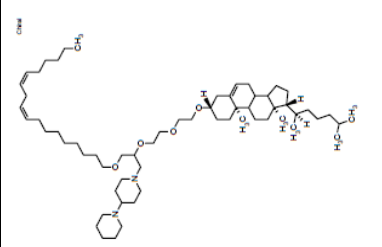
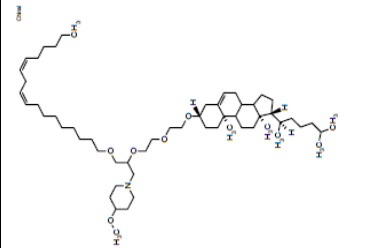
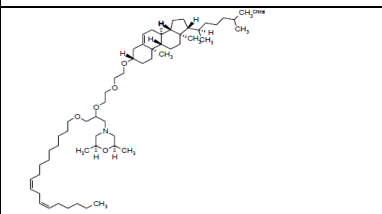


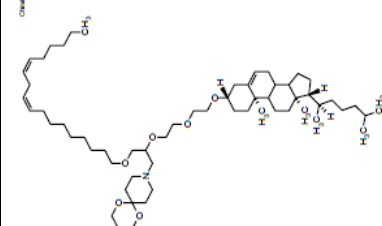
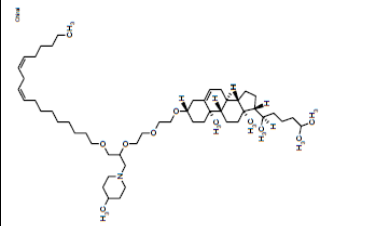
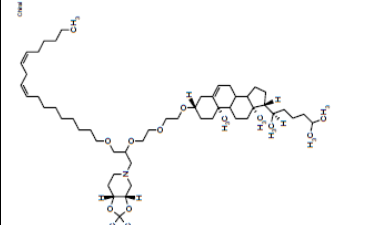
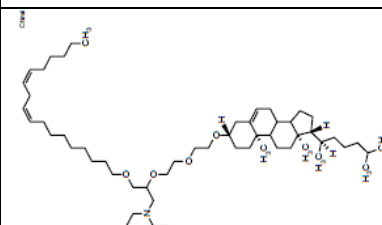
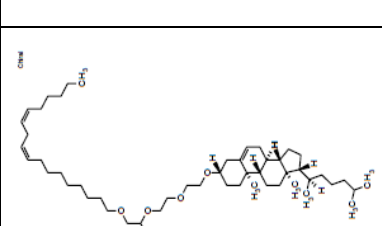
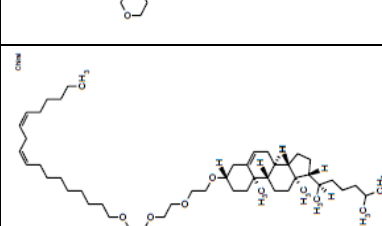
não representa um anel contendo hidrogênio de 3 membros quimicamente impossível mas ao contrário representa o seguinte.

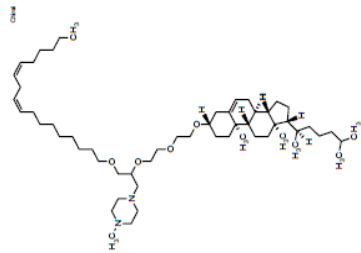
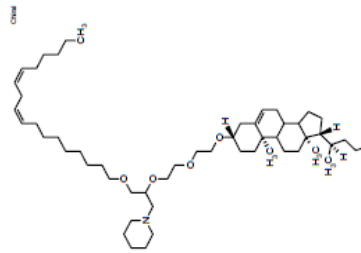
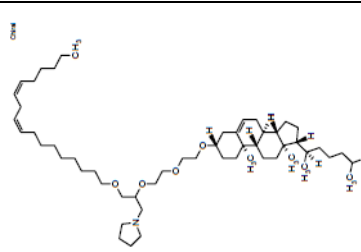
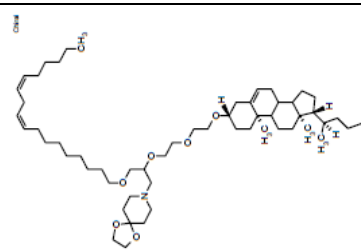
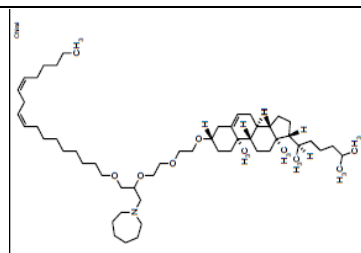
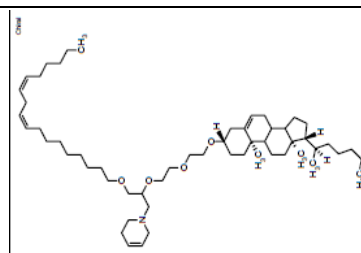


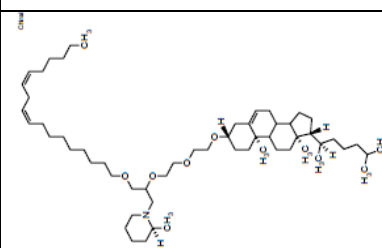
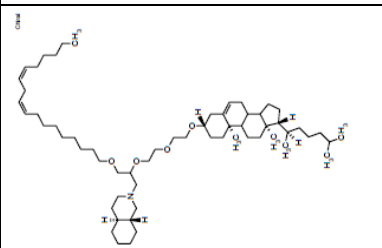
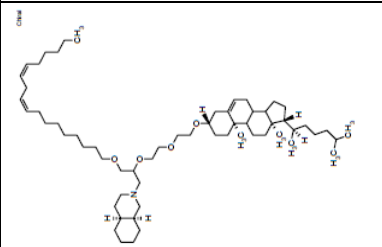
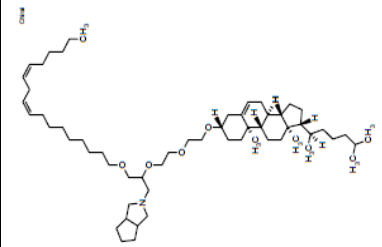
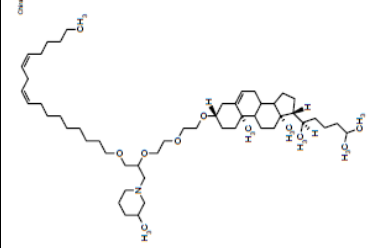
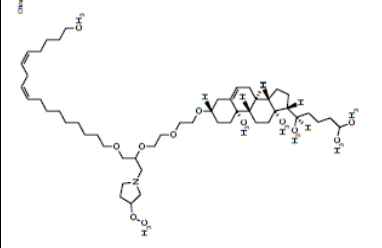
[000702] A tabela 6 fornece as estruturas dos lipídeos catiônicos da invenção.

Tabela 6 - Caracterização e estruturas para Lipídeos Catiônicos

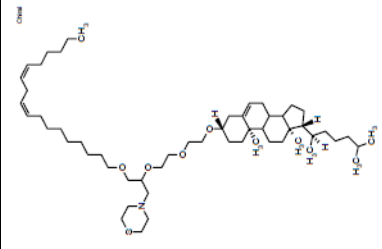
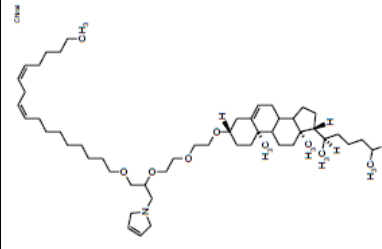
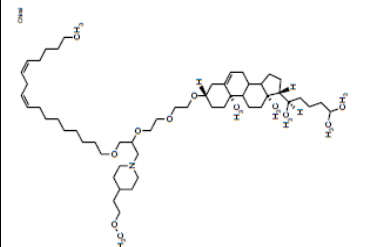
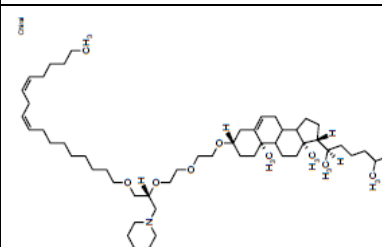
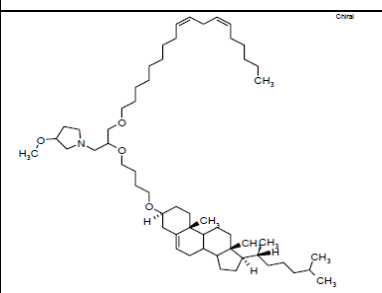
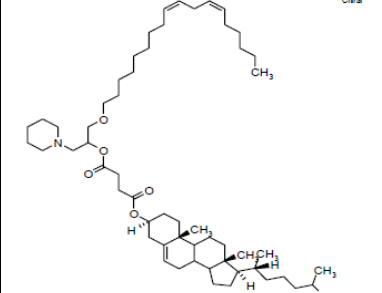
Lipídeo	Estrutura	R ¹ -N-R ²	Y ¹	L
E0001		H ¹⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0002		H ²	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0003		H ¹	Y ¹⁻ⁱⁱ	L ^{c-i}
E0004		H ¹⁰	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0005		H ¹¹	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0006		H ¹³	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}

Lipídeo	Estrutura	R ¹ -N-R ²	Y ¹	L
E0007		H ¹⁹	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0008		H ⁴³	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0009		H ³⁴	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0010		H ²²	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0011		H ¹	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0012		H ³	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}

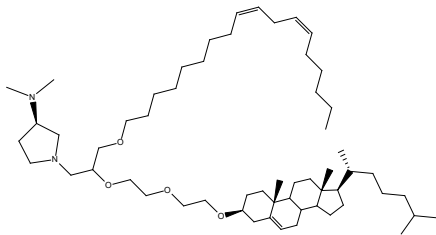
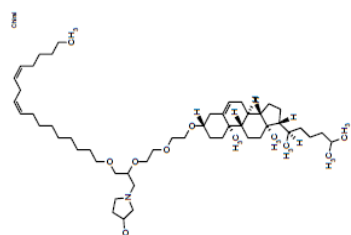
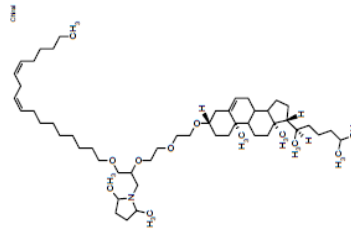
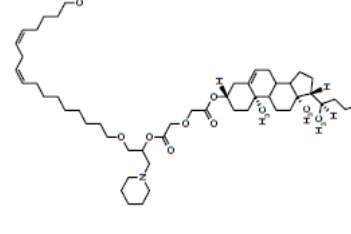
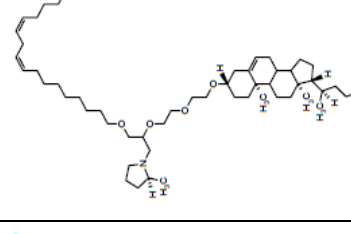
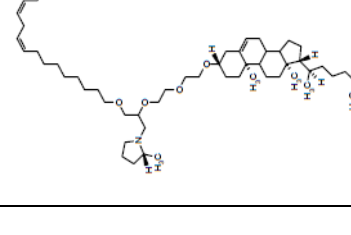
Lipídeo	Estrutura	R ¹ -N-R ²	Y ¹	L
E0013		H ⁴	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0014		H ⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0015		H ⁷	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0016		H ⁸	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0017		H ¹⁴	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0018		H ¹⁶	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}

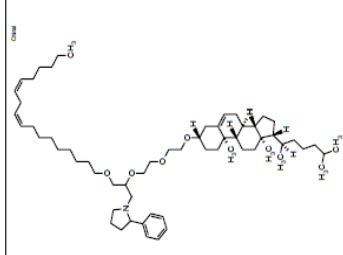
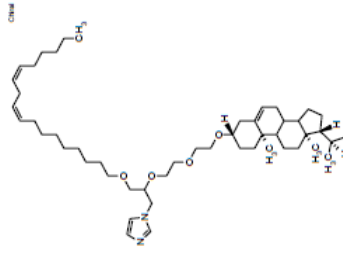
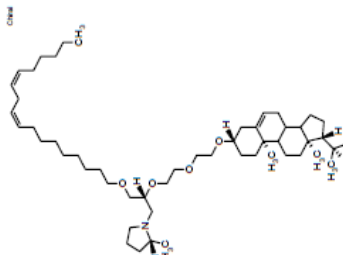
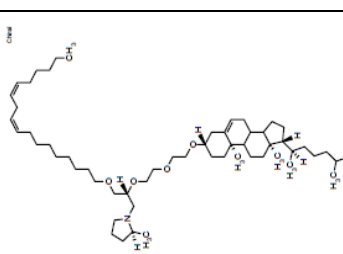
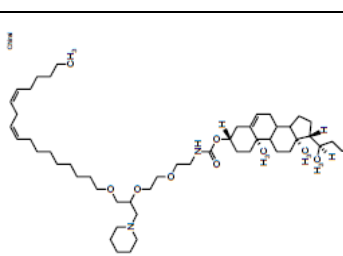
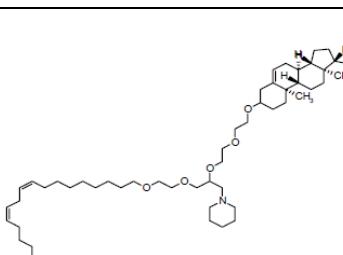
Lipídeo	Estrutura	R ¹ -N-R ²	Y ¹	L
E0019		H ¹⁷	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0020		H ²¹	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0021		H ²³	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0022		H ²⁴	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0023		H ²⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0024		H ³⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}

Lipídeo	Estrutura	R ¹ -N-R ²	Y ¹	L
E0025		H ²⁷	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0026		H ²⁸	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0027		H ⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-ii}
E0028		H ¹	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-ii}
E0029		H ²⁹	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0030		H ³⁰	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}

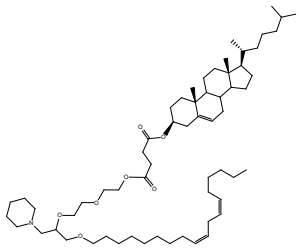
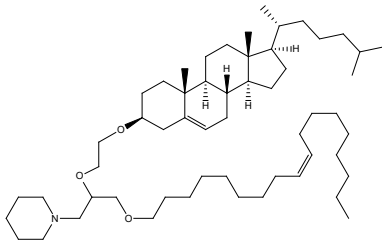
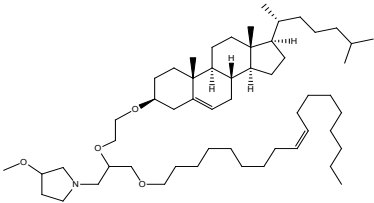
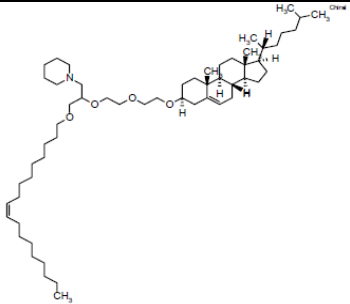
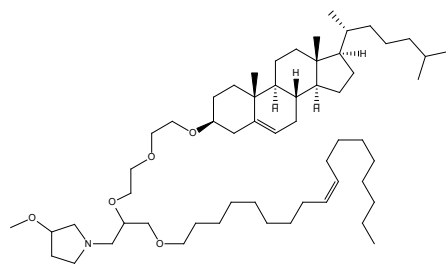
Lipídeo	Estrutura	R ¹ -N-R ²	Y ¹	L
E0031		H ³¹	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0032		H ²⁰	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0033		H ³³	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0034		H ⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0035		H ³⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-ii}
E0036		H ⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-iii}

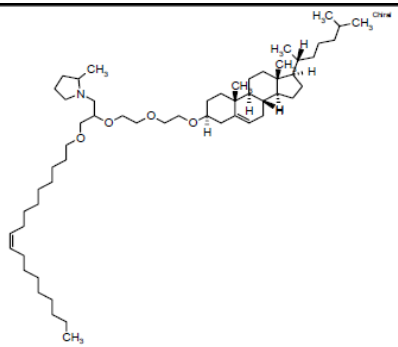
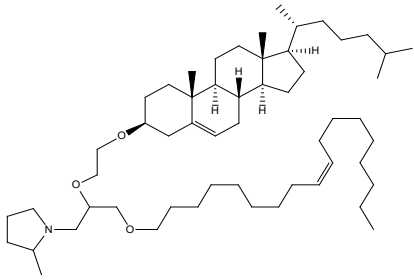
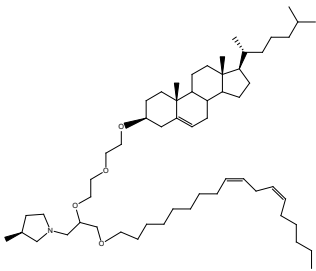
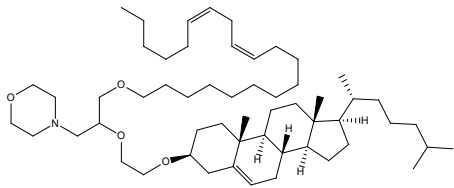
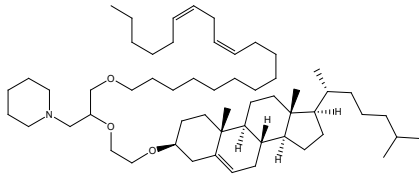
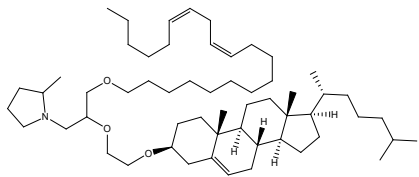
Lipídeo	Estrutura	R ¹ -N-R ²	Y ¹	L
E0037		H ⁴⁴	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0038		H ³⁶	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0039		H ³⁷	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0040	Mistura dos isômeros E0053 e E0052	H ^{12/26}	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0041		H ³²	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0042		H ³⁹	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0043		H ⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}

Lipídeo	Estrutura	R ¹ -N-R ²	Y ¹	L
E0044		H ⁴⁸	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0045		H ⁴¹	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0046		H ⁴²	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0047		H ⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-v}
E0048		H ²⁶	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0049		H ¹²	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}

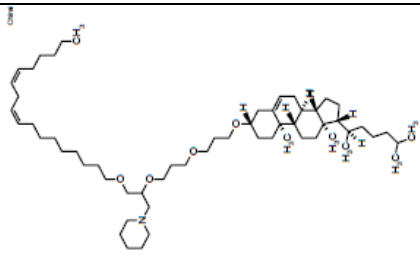
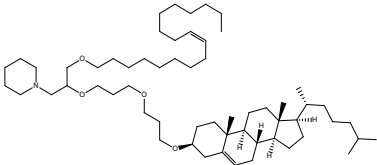
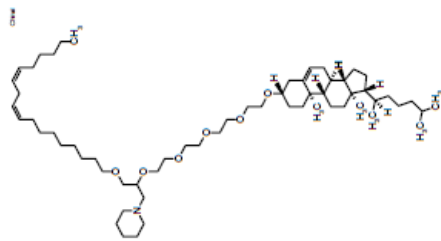
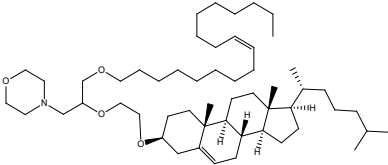
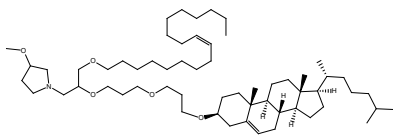
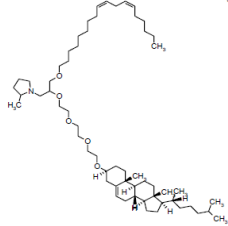
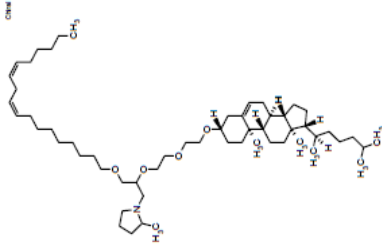
Lipídeo	Estrutura	R ¹ -N-R ²	Y ¹	L
E0050		H ⁹	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0051		H ⁴⁰	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0052		H ¹²	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0053		H ²⁶	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0054		H ⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-vi}
E0055		H ⁵	Y ¹⁻ⁱⁱⁱ	L ^{c-i}

Lipídeo	Estrutura	R ¹ -N-R ²	Y ¹	L
E0056		H ⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-xviii}
E0057		H ⁴⁷	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0058		H ⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-xv}
E0059		H ⁴⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}

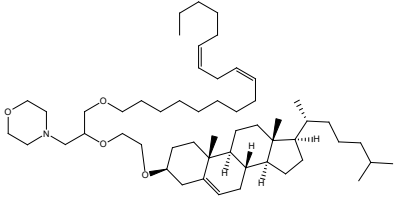
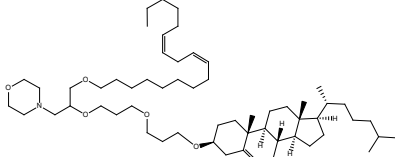
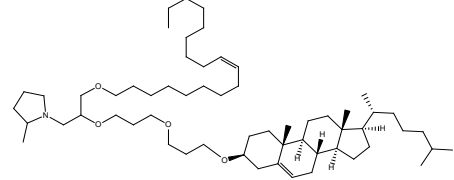
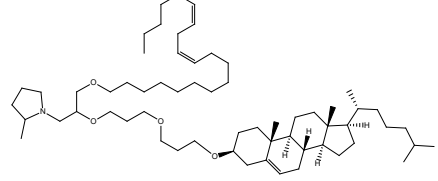
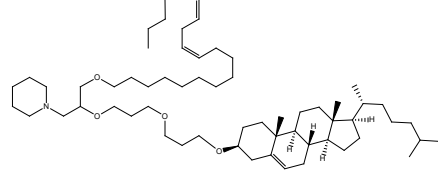
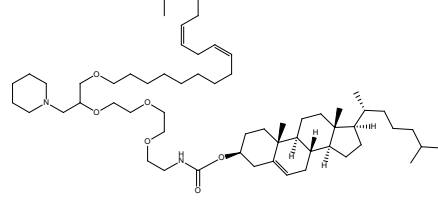
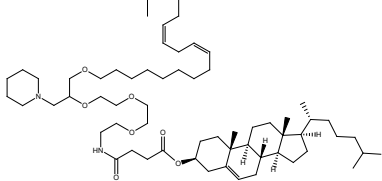
Lipídeo	Estrutura	R ¹ -N-R ²	Y ¹	L
E0060		H ⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-xvi}
E0061		H ⁵	Y ^{1-iv}	L ^{c-viii}
E0062		H ³⁵	Y ^{1-iv}	L ^{c-viii}
E0063		H ⁵	Y ^{1-iv}	L ^{c-i}
E0064		H ³⁵	Y ^{1-iv}	L ^{c-i}

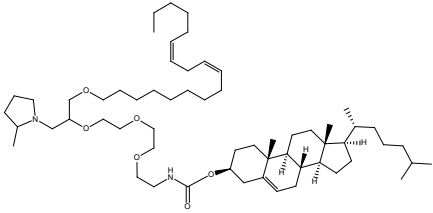
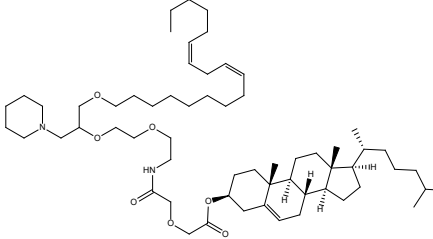
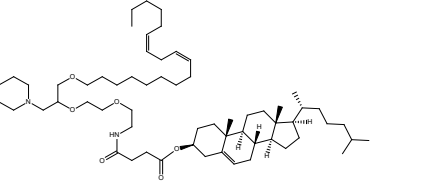
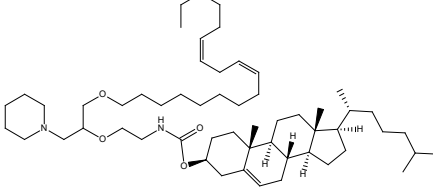
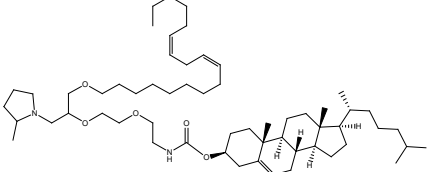
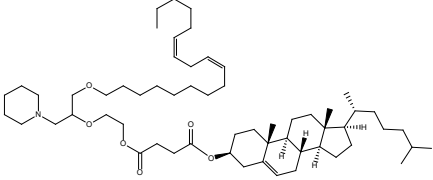
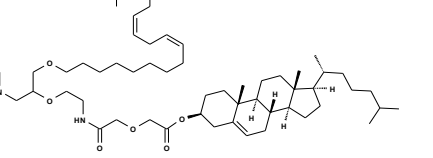
Lipídeo	Estrutura	R ¹ -N-R ²	Y ¹	L
E0065		H ^{12/26}	Y ^{I-iv}	L ^{c-i}
E0066		H ^{12/26}	Y ^{I-iv}	L ^{c-viii}
E0067		H ⁴⁶	Y ^{I-i}	L ^{c-i}
E0068		H ¹	Y ^{I-v}	L ^{c-viii}
E0069		H ⁵	Y ^{I-v}	L ^{c-viii}
E0070		H ^{12/26}	Y ^{I-v}	L ^{c-viii}

Lipídeo	Estrutura	R ¹ -N-R ²	Y ¹	L
E0071		H ⁵	Y ^{1-v}	L ^{c-i}
E0072		H ^{12/26}	Y ^{1-v}	L ^{c-i}
E0073		H ¹	Y ^{1-v}	L ^{c-i}
E0074		H ¹	Y ^{1-v}	L ^{c-vii}
E0075		H ^{12/26}	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-vii}
E0076		H ⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-viii}

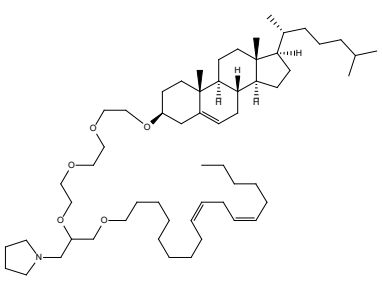
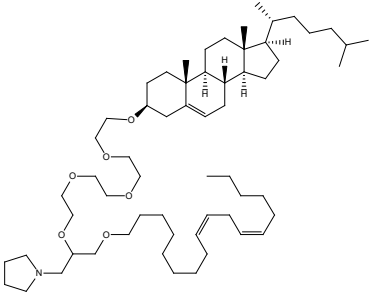
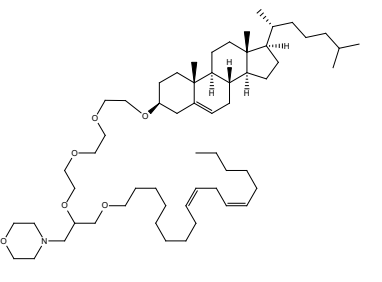
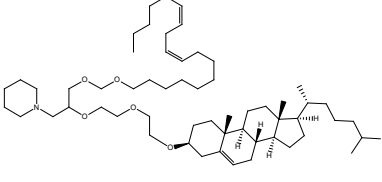
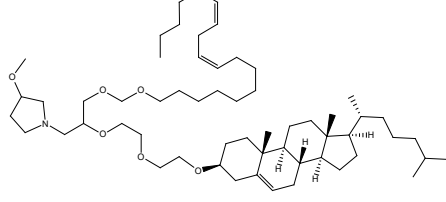
Lipídeo	Estrutura	R ¹ -N-R ²	Y ¹	L
E0077		H ⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-vii}
E0078		H ⁵	Y ^{1-iv}	L ^{c-vii}
E0079		H ⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-ix}
E0080		H ¹	Y ^{1-iv}	L ^{c-viii}
E0081		H ³⁵	Y ^{1-iv}	L ^{c-vii}
E0082		H ^{12/26}	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-x}
E0083		H ^{12/26}	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}

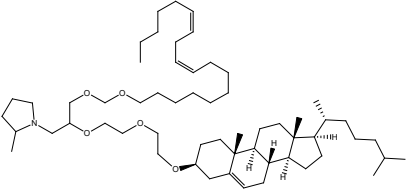
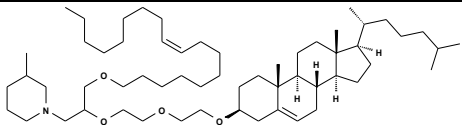
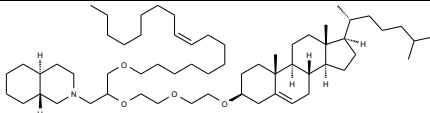
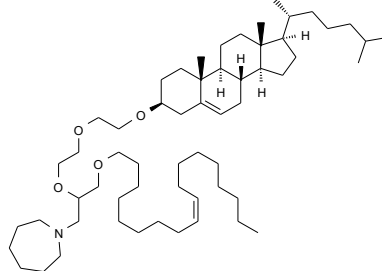
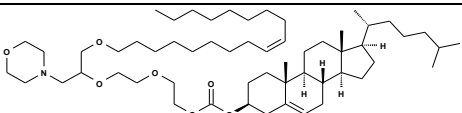
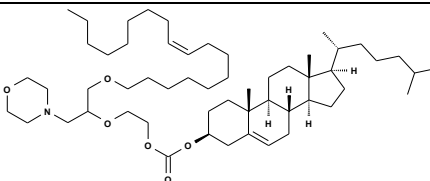
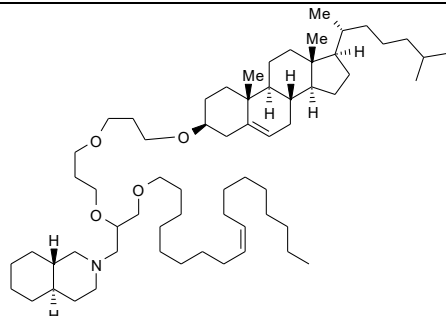
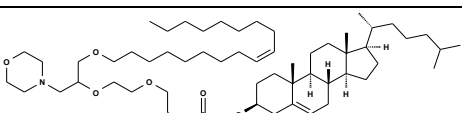
Lipídeo	Estrutura	R ¹ -N-R ²	Y ¹	L
E0084		H ^{12/26}	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-ix}
E0085		H ¹	Y ^{1-iv}	L ^{c-i}
E0086		H ¹	Y ^{1-iv}	L ^{c-vii}
E0087		H ³⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-viii}
E0088		H ³⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-vii}
E0089		H ³⁵	Y ^{1-v}	L ^{c-viii}
E0090		H ³⁵	Y ^{1-v}	L ^{c-i}
E0091		H ³⁵	Y ^{1-v}	L ^{c-vii}

Lipídeo	Estrutura	R ¹ -N-R ²	Y ¹	L
E0092		H ¹	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-viii}
E0093		H ¹	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-vii}
E0094		H ^{12/26}	Y ^{1-iv}	L ^{c-vii}
E0095		H ^{12/26}	Y ^{1-v}	L ^{c-vii}
E0096		H ⁵	Y ^{1-v}	L ^{c-vii}
E0097		H ⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-xiv}
E0098		H ⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-xi}

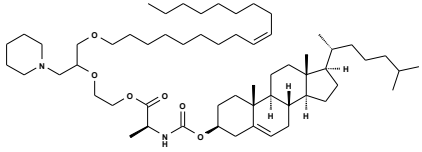
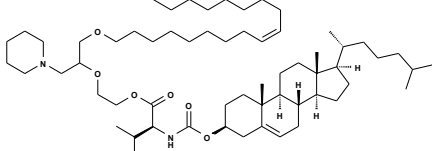
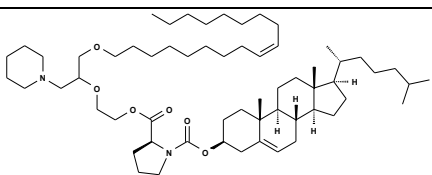
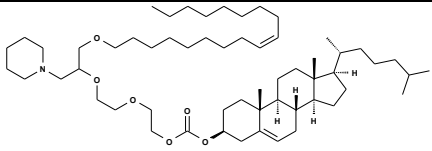
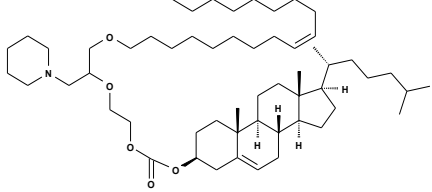
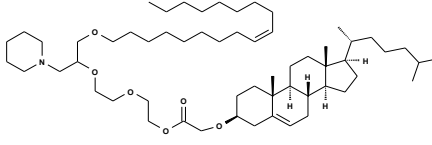
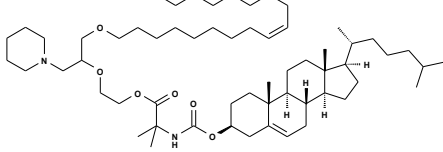
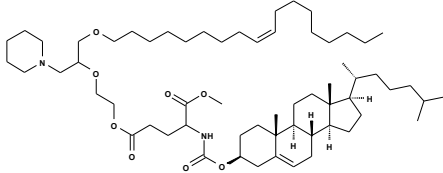
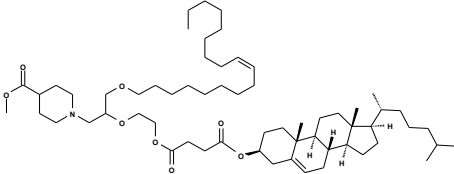
Lipídeo	Estrutura	R ¹ -N-R ²	Y ¹	L
E0099		H ^{12/26}	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-xiv}
E0100		H ⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-xii}
E0101		H ⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-xiii}
E0102		H ⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-xxi}
E0103		H ^{12/26}	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-vi}
E0104		H ⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-xvii}
E0105		H ⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-xix}

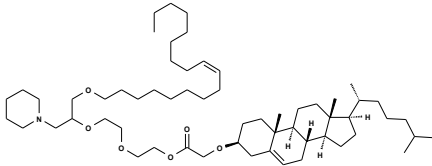
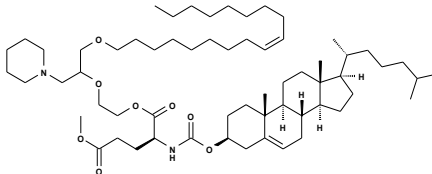
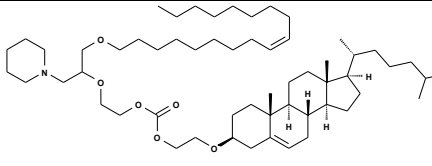
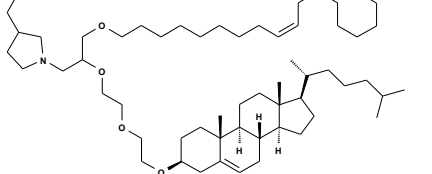
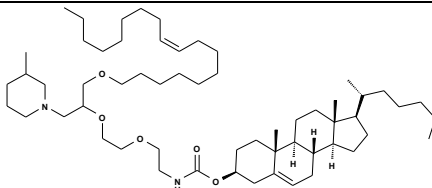
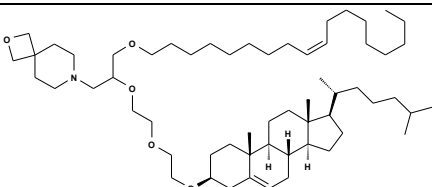
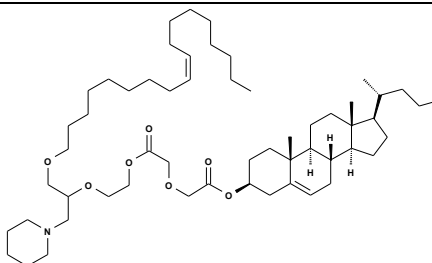
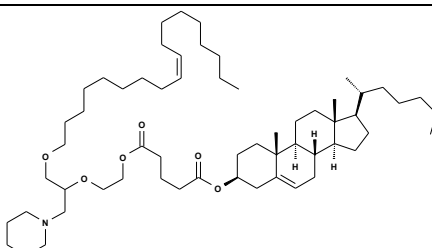
Lipídeo	Estrutura	R ¹ -N-R ²	Y ¹	L
E0106		H ⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-xx}
E0107		H ¹⁶	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-ix}
E0108		H ^{12/26}	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-xi}
E0109		H ¹	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-ix}
E0110		H ⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-xxii}
E0111		H ⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-xxiii}

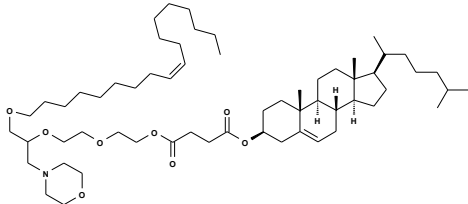
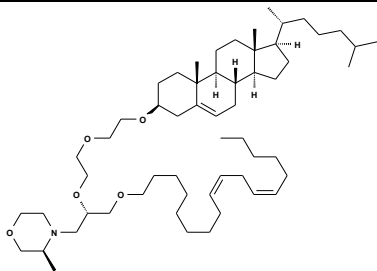
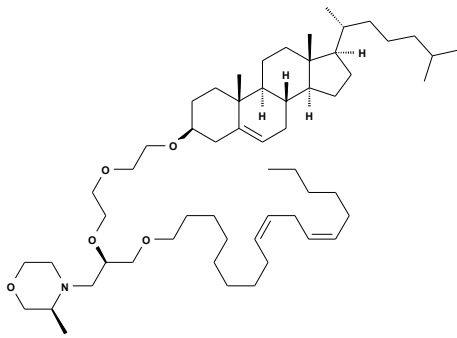
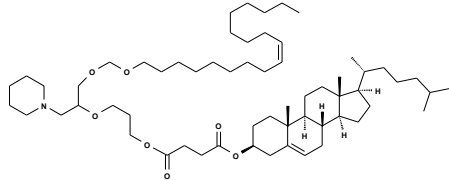
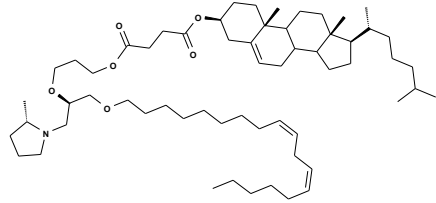
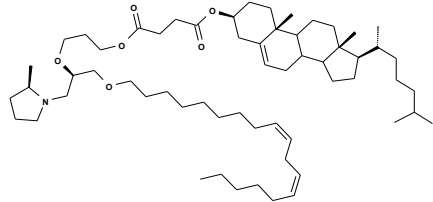
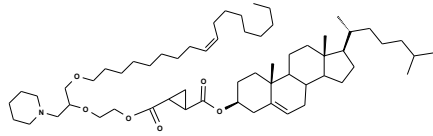
Lipídeo	Estrutura	R ¹ -N-R ²	Y ¹	L
E0112		H ⁷	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-x}
E0113		H ⁷	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-ix}
E0114		H ¹	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-x}
E0115		H ⁵	Y ^{1-vi}	c-i
E0116		H ³⁵	Y ^{1-vi}	c-i

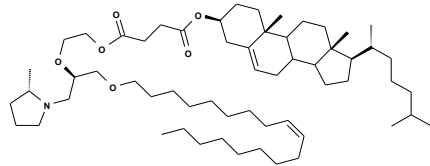
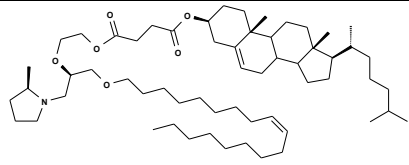
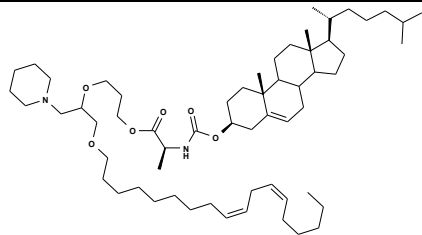
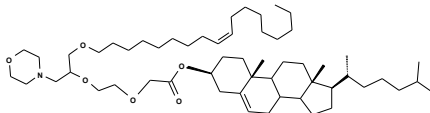
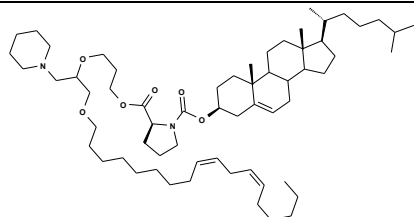
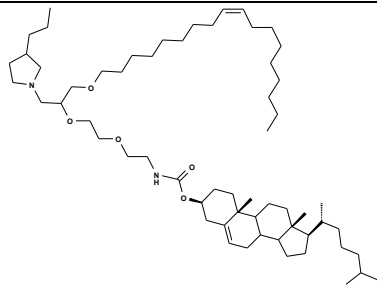
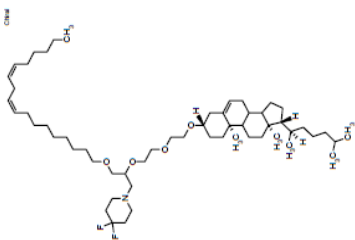
Lipídeo	Estrutura	R ¹ -N-R ²	Y ¹	L
E0117		H ^{12/26}	Y ^{1-vi}	c-i
E0118	Outra mistura dos isômeros E0053 e E0052	H ^{12/26}	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-i}
E0119		H ²⁵	Y ^{1-iv}	L ^{c-i}
E0120		H ²¹	Y ^{1-iv}	L ^{c-i}
E0121		H ¹⁴	Y ^{1-iv}	L ^{c-i}
E0122		H ¹	Y ^{1-iv}	L ^{c-xviii}
E0123		H ¹	Y ^{1-iv}	L ^{c-xxiv}
E0124		H ²¹	Y ^{1-iv}	L ^{c-vii}
E0125		H ¹	Y ^{1-iv}	L ^{c-xxv}

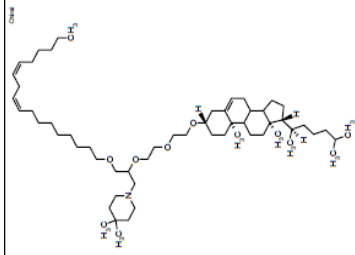
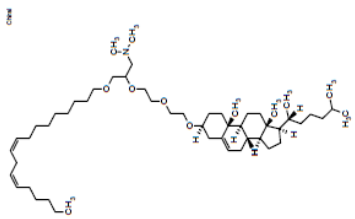
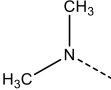
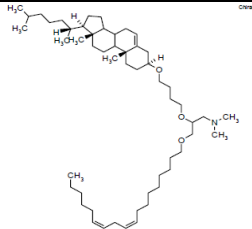
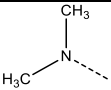
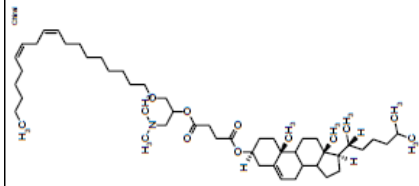
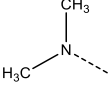
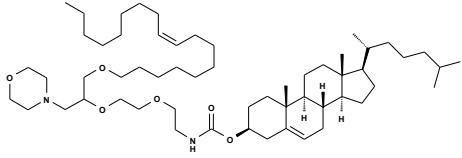
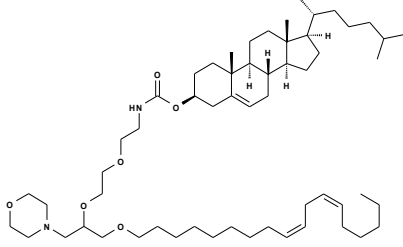
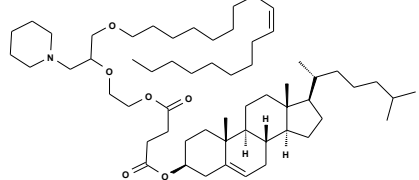
Lipídeo	Estrutura	R ¹ -N-R ²	Y ¹	L
E0126		H ¹⁴	Y ^{1-iv}	L ^{c-vii}
E0127		H ²⁵	Y ^{1-iv}	L ^{c-vii}
E0128		H ¹	Y ^{1-iv}	L ^{c-xxvi}
E0129		H ⁴⁹	Y ^{1-iv}	L ^{c-xvii}
E0130		H ⁸	Y ^{1-iv}	L ^{c-xvii}
E0131		H ⁵	Y ^{1-iv}	L ^{c-xxvi}
E0132		H ⁵	Y ^{1-iv}	L ^{c-xxvii}
E0133		H ⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-xxviii}
E0134		H ⁵	Y ¹⁻ⁱ	L ^{c-xxix}

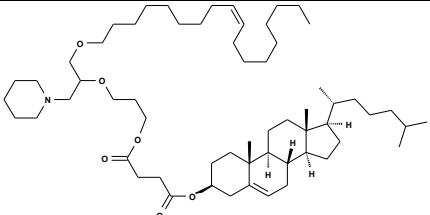
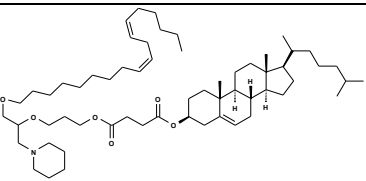
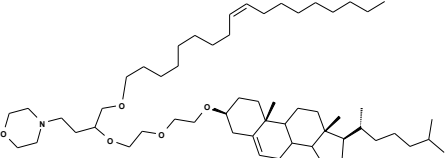
Lipídeo	Estrutura	R ¹ -N-R ²	Y ¹	L
E0135		H ⁵	Y ^{1-iv}	L ^{c-xxx}
E0136		H ⁵	Y ^{1-iv}	L ^{c-xxxii}
E0137		H ⁵	Y ^{1-iv}	L ^{c-xxxii}
E0138		H ⁵	Y ^{1-iv}	L ^{c-xviii}
E0139		H ⁵	Y ^{1-iv}	L ^{c-xxiv}
E0140		H ⁵	Y ^{1-iv}	L ^{c-xxv}
E0141		H ⁵	Y ^{1-iv}	L ^{c-xxxiii}
E0142		H ⁵	Y ^{1-iv}	L ^{c-xxxiv}
E0143		H ⁵⁰	Y ^{1-iv}	L ^{c-xvii}

Lipídeo	Estrutura	R ¹ -N-R ²	Y ¹	L
E0144		H ⁵	Y ^{1-iv}	L ^{c-xxv}
E0145		H ⁵	Y ^{1-iv}	L ^{c-xxxv}
E0146		H ⁵	Y ^{1-iv}	L ^{c-xxxvi}
E0147		H ²⁷	Y ^{1-iv}	L ^{c-i}
E0148		H ²⁵	Y ^{1-iv}	L ^{c-vi}
E0149		H ⁵¹	Y ^{1-iv}	L ^{c-i}
E0150		H ⁵	Y ^{1-iv}	L ^{c-xxxvii}
E0151		H ⁵	Y ^{1-iv}	L ^{c-xxxviii}

Lipídeo	Estrutura	R ¹ -N-R ²	Y ¹	L
E0152		H ¹	Y ^{1-iv}	L ^{c-xvi}
E0158		H ⁵²	Y ^{l-i}	L ^{c-i}
E0159		H ⁵²	Y ^{l-i}	L ^{c-i}
E0160		H ⁵	Y ^{l-vii}	L ^{c-xxxix}
E0161		H ²⁶	Y ^{l-i}	L ^{c-xxxix}
E0162		H ¹²	Y ^{l-i}	L ^{c-xxxix}
E0163		H ⁵	Y ^{1-iv}	L ^{c-xxxx}

Lipídeo	Estrutura	R ¹ -N-R ²	Y ¹	L
E0164		H ²⁶	Y ^{1-iv}	L ^{c-xvii}
E0165		H ¹²	Y ^{1-iv}	L ^{c-xvii}
E0166		H ⁵	Y ^{l-i}	L ^{c-xxxxi}
E0167		H ¹	Y ^{l-iv}	L ^{c-xxxxii}
E0168		H ⁵	Y ^{l-i}	L ^{c-xxxxiii}
E0169		H ²⁷	Y ^{l-iv}	L ^{c-vi}
E0170		H ⁶	Y ^{l-i}	L ^{c-i}

Lipídeo	Estrutura	R ¹ -N-R ²	Y ¹	L
E0171		H ¹⁸	Y ^{I-i}	L ^{c-i}
E0172 (comparativo)			Y ^{I-i}	L ^{c-i}
E0173 (comparativo)			Y ^{I-i}	L ^{c-ii}
E0174 (comparativo)			Y ^{I-i}	L ^{c-iii}
E0175		H ¹	Y ^{I-iv}	L ^{c-vi}
E0176		H ¹	Y ^{I-i}	L ^{c-vi}
E0177		H ⁵	Y ^{I-iv}	L ^{c-xvii}

Lipídeo	Estrutura	R ¹ -N-R ²	Y ¹	L
E0178		H ⁵	Y ^{I-iv}	L ^{c-xxxix}
E0179		H ⁵	Y ^{I-i}	L ^{c-xxxiv}
E0180		H ¹	Y ^{I-iv}	L ^{c-i}

[000703] Para cada um dos compostos acima descritos exceto E0180, Y² é colesterol ligado a L por meio de um átomo de oxigênio na posição 3 do anel esteroide A (estando ausente o átomo de hidrogênio no referido grupo hidróxi); X¹ e X² são O; a = metileno; b = metileno e c está ausente; enquanto que para E0180, a = etileno.

[000704] Além dos dados de caracterização abaixo, é feita a ¹H RMN de todos os lipídeos para avaliar a pureza e qualquer isomerização de olefina que possa ter ocorrido na síntese. Especificamente, as integrais para o singlete derivado de colesterol, normalmente a ou próximo a 0,68 ppm, são comparadas aos sinais derivados de olefina na faixa de 5,2 a 5,5 ppm. A integral de olefina para as desejadas olefinas cis, não conjugadas e o hidrogênio olefínico de colesterol é comparada a quaisquer novos sinais acima de 5,5 ppm que corresponderam a produtos isomerizados. Em todos os casos, o grau de isomerização é menor que 10% conforme determinado por comparação dos sinais integrados na ¹H RMN.

Exemplo 67

[000705] A caracterização de RMN dos vários lipídeos é fornecida abaixo.

E0008

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,25-5,48 (m, 5H), 3,69-3,86 (m, 2H), 3,55-3,69 (m, 7H), 3,34-3,55 (m, 4H), 3,07-3,25 (m, 1H), 2,70-3,01 (m, 4H), 2,30-2,53 (m, 3H), 2,15-2,30 (m, 1H), 1,78-2,14 (m, 11H), 1,42-1,66 (m, 12H), 0,97-1,42 (m, 34H), 0,81-0,97 (m, 16H), 0,68 (s, 3H) ppm.

E0006

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,25-5,47 (m, 5H), 3,56-3,85 (m, 11H), 3,48-3,56 (m, 1H), 3,36-3,48 (m, 3H), 3,11-3,27 (m, 1H), 2,66-2,83 (m, 4H), 2,41-2,49 (m, 2H), 2,30-2,41 (m, 1H), 2,15-2,28 (m, 1H), 1,72-2,12 (m, 11H), 0,96-1,70 (m, 60H), 0,68 (s, 3H) ppm.

^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 140,9, 130,2, 130,1, 128,0, 127,9, 121,6, 79,5, 72,0, 71,7, 71,6, 70,9, 69,4, 67,3, 60,2, 60,1, 59,7, 56,8, 56,1, 50,2, 42,3, 39,8, 39,5, 39,0, 37,2, 36,8, 36,2, 35,8, 31,9, 31,9, 31,5, 29,7, 29,5, 29,5, 29,3, 29,3, 29,0, 28,3, 28,2, 28,0, 27,2, 27,2, 26,2, 25,6, 24,3, 23,8, 22,8, 22,7, 22,6, 22,6, 21,0, 19,4, 18,7, 14,1, 11,8 ppm.

E0003

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,22-5,46 (m, 7H), 3,66-3,93 (m, 5H), 3,54-3,66 (m, 6H), 3,35-3,54 (m, 4H), 3,07-3,23 (m, 1H), 2,73-2,89 (m, 4H), 2,39-2,73 (m, 4H), 2,28-2,39 (m, 1H), 2,28-2,39 (m, 1H), 1,70-2,12 (m, 10H), 1,20-1,65 (m, 24H), 0,94-1,19 (m, 13H), 0,77-0,94 (m, 14H), 0,66 (s, 3H) ppm.

^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 140,9, 130,4, 130,0, 128,3, 128,1, 127,8, 127,6, 121,6, 79,5, 71,6, 70,8, 70,7, 69,2, 67,3, 60,1, 56,7, 56,1, 54,2, 50,1, 42,3, 39,7, 39,5, 39,0, 37,2, 36,8, 36,2, 35,8, 31,9, 31,8, 31,5, 29,5, 29,4, 29,3, 28,3, 28,2, 28,0, 27,2, 27,2, 25,8, 25,6, 24,3, 23,8, 22,8, 22,6, 22,5, 21,0, 19,4, 18,7, 14,1, 11,8 ppm.

E0002

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,26-5,44 (m, 5H), 3,68-3,84

(m, 3H), 5,54-3,68 (m, 7H), 3,32-3,54 (m, 6H), 3,09-3,24 (m, 1H), 2,68-2,80 (m, 2H), 2,27-2,58 (m, 3H), 2,12-2,27 (m, 1H), 1,69-2,12 (m, 9H), 1,41-1,69 (m, 20H), 1,19-1,40 (m, 20H), 0,95-1,19 (m, 11H), 0,78-0,95 (m, 12 H), 0,66 (s, 3H) ppm.

E0001

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7,10-7,24 (m, 3H), 6,96-7,10 (m, 1H), 5,21-5,48 (m, 5H), 3,73-3,90 (m, 3H), 3,37-3,72 (m, 11H), 3,10-3,25 (m, 1H), 2,72-2,86 (m, 2H), 2,28-2,42 (m, 1H), 2,14-2,28 (m, 1H), 1,92-2,14 (m, 6H), 1,78-1,92 (m, 4H), 1,22-1,78 (m, 34 H), 0,95-1,22 (m, 13H), 0,84-0,95 (m, 13H), 0,68 (s, 3H) ppm.

E0004

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,24-5,44 (m, 5H), 3,66-3,83 (m, 2H), 3,54-3,65 (m, 7H), 3,34-3,51 (m, 4H), 3,11-3,23 (m, 1H), 2,94-3,10 (m, 2H), 2,56-2,87 (m, 6,5H), 2,41-2,50 (d, $J = 5,02$ Hz, 2H), 2,29-2,40 (m, 2,5H), 1,96-2,26 (m, 8H), 1,62-1,96 (m, 8H), 1,62-1,96 (m, 11H), 1,40-1,61 (m, 11H), 1,22-1,40 (m, 20H), 0,81-1,21 (m, 26H), 0,66 (s, 3H) ppm.

^{13}C RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ 142,5, 140,9, 139,7, 130,1, 130,1, 128,7, 127,9, 127,9, 125,8, 121,5, 79,4, 77,2, 71,8, 71,6, 70,8, 70,8, 69,3, 67,3, 63,1, 59,3, 56,7, 56,1, 53,6, 53,3, 50,1, 49,9, 42,2, 39,7, 39,4, 39,0, 37,2, 36,8, 36,1, 35,7, 31,9, 31,8, 31,5, 29,6, 29,5, 29,4, 29,3, 29,3, 28,3, 28,2, 27,9, 27,2, 27,1, 27,0, 26,9, 26,1, 25,6, 24,8, 24,2, 23,8, 22,8, 22,5, 21,3, 21,0, 19,3, 18,6, 14,0, 11,8 ppm.

E0005

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,28-5,44, (m, 3H), 3,69-3,82 (m, 2H), 3,57-3,67 (m, 7H), 3,48-3,64 (m, 1H), 3,39-3,48 (m, 3H), 3,33 (s, 3H), 3,12-3,24 (m, 2H), 2,70-2,86 (m, 4H), 2,42-2,47 (d, $J = 6,02$ Hz, 2H), 2,33-2,42 (m, 3H), 1,97-2,10 (m, 5H), 1,76-1,97 (m, 7H), 1,42-1,64 (m, 12H), 1,23-1,42 (m, 20H), 0,97-1,23 (m, 12H),

0,81–0,97 (m, 13H), 0,68 (s, 3H) ppm.

^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 140,9, 130,2, 130,1, 127,9, 127,9, 121,5, 79,5, 77,5, 72,5, 72,1, 70,9, 70,8, 69,3, 67,3, 63,1, 59,3, 56,7, 56,1, 55,5, 52,0, 51,7, 50,1, 42,3, 39,8, 39,5, 39,0, 37,2, 36,8, 36,2, 35,8, 31,9, 31,9, 31,5, 31,0, 29,7, 29,5, 29,5, 29,3, 29,3, 28,3, 28,2, 28,0, 27,2, 27,2, 26,1, 25,6, 24,3, 23,8, 22,8, 22,6, 21,0, 19,4, 18,7, 14,1, 11,8 ppm.

E0007

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,26-5,44 (m, 5H), 3,84-3,94 (t, $J = 5,56$ Hz, 4H), 3,68-3,87 (m, 2H), 3,56-3,67 (m, 7H), 3,47-3,54 (m, 1H), 3,38-3,47 (m, 3H), 3,11-3,23 (m, 1H) 2,73–2,82 (t, $J = 6,44$ Hz, 2H), 2,42–2,57 (m, 5H), , 2,32–2,41 (m, 1H), 2,11–2,27 (m, 2H), 1,97–2,10 (m, 6H), 1,76–1,96 (m, 7H), 1,66–1,75 (m, 2H), 1,41–1,62 (m, 9H), 1,22–1,41 (m, 20H), 0,81–1,22 (m, 25H), 0,67 (s, 3H) ppm.

^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 141,0, 130,1, 130,1, 127,9, 127,9, 121,5, 96,2, 79,5, 77,6, 72,2, 71,6, 70,9, 70,8, 69,4, 67,3, 63,1, 59,3, 59,1, 56,8, 56,1, 50,5, 50,2, 42,3, 39,8, 39,5, 39,1, 37,2, 36,8, 36,2, 35,7, 32,8, 31,9, 31,9, 31,5, 29,7, 29,5, 29,4, 29,3, 29,3, 28,3, 28,2, 28,0, 27,2, 27,2, 26,1, 25,6, 25,6, 24,3, 23,8, 22,8, 22,5, 21,0, 19,3, 18,7, 14,0, 11,8 ppm.

E0009

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,27-5,44 (m, 5H), 4,07-4,22 (m, 2H), 3,67-3,83 (m, 2H), 3,55-3,67 (m, 6H), 3,37-3,52 (m, 4H), 3,12-3,25 (m, 1H), 2,81–2,90 (m, 1H), 2,73–2,81 (t, $J = 6,53$ Hz, 2H), 2,42–2,64 (m, 3H), 2,15–2,41 (m, 4H), 1,76–2,11 (m, 11H), 1,64-1,72 (m, 4H), 1,42-1,63 (m, 12H), 1,21–1,41 (m, 22H), 0,81–1,22 (m, 26H), 0,68 (s, 3H) ppm.

^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 140,9, 130,2, 130,1, 127,9, 127,9, 121,5, 79,5, 77,2, 72,7, 72,0, 71,6, 71,5, 70,8, 69,4, 67,3,

61,9, 59,5, 56,7, 56,5, 56,1, 50,1, 49,3, 49,3, 42,3, 39,7, 39,5, 39,0, 37,2, 36,8, 36,2, 35,8, 31,9, 31,9, 31,5, 29,7, 29,5, 29,5, 29,3, 29,3, 28,4, 28,3, 28,2, 28,0, 27,4, 27,4, 27,2, 27,2, 26,5, 26,1, 25,6, 24,3, 23,8, 22,8, 22,6, 22,6, 21,0, 19,4, 18,7, 14,1, 11,8 ppm.

E0170

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,26-5,45 (m, 5H), 3,68-3,82 (m, 2H), 3,56-3,68 (m, 7H), 3,38-3,53 (m, 4H), 3,11-3,24 (m, 1H), 2,73-2,82 (t, $J = 6,53$ Hz, 2H), 2,56-2,69 (m, 4H), 2,50-2,56 (m, 2H), 2,32-2,41 (m, 1H), 2,09-2,27 (m, 2H), 1,77-2,09 (m, 13H), 1,42-1,63 (m, 9H), 1,21-1,42 (m, 20H), 0,83-1,21 (m, 25H), 0,68 (s, 3H) ppm.

^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 140,9, 130,2, 130,1, 128,0, 127,9, 124,4, 122,0, 121,5, 119,6, 79,5, 77,6, 77,2, 71,8, 71,6, 70,9, 70,8, 69,4, 67,3, 58,7, 56,7, 56,1, 50,7, 50,1, 42,3, 39,7, 39,5, 39,0, 37,2, 36,8, 36,1, 35,8, 34,0, 31,9, 31,8, 31,5, 29,6, 29,5, 29,4, 29,3, 28,3, 28,2, 28,0, 27,2, 27,2, 26,1, 25,6, 24,3, 23,8, 22,8, 22,6, 21,0, 19,3, 18,7, 14,1, 11,8 ppm.

E0171

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,27-5,46 (m, 5H), 3,58-3,82 (m, 9H), 3,38-3,54 (m, 4H), 3,13-3,26 (m, 1H), 2,74-2,82 (m, 2H), 2,31-2,50 (m, 6H), 2,16-2,2 (m, 1H), 1,70-2,10 (m, 12H), 1,24-1,65 (m, 33H), 0,97-1,23 (m, 13H), 0,82-0,97 (m, 19H), 0,68 (s, 3H) ppm.

^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 141,0, 130,2, 130,1, 127,9, 127,9, 121,5, 79,5, 77,2, 73,2, 72,5, 72,3, 71,6, 70,9, 70,8, 69,3, 67,3, 66,0, 61,9, 60,9, 60,2, 56,7, 56,1, 50,7, 50,1, 42,3, 39,8, 39,5, 39,0, 38,7, 37,2, 36,8, 36,2, 35,8, 31,9, 31,9, 31,5, 29,7, 29,5, 29,5, 29,3, 29,3, 28,3, 28,2, 28,0, 27,2, 27,2, 26,1, 25,6, 24,3, 23,8, 22,8, 22,6, 21,0, 19,4, 18,7, 14,1, 11,8 ppm.

E0010

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 5,26-5,45 (m, 5H), 3,53-3,84

(m, 9H), 3,37-3,53 (m, 4H), 3,13-3,24 (m, 1H), 2,91-3,00 (m, 1H), 2,74-2,86 (m, 2H), 2,28-2,43 (m, 2H), 2,10-2,28 (m, 2H), 1,42-2,10 (m, 32H), 0,82-1,41 (m, 50H), 0,68 (s, 3H) ppm.

^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 141,0, 130,2, 130,1, 127,9, 127,9, 121,5, 79,5, 77,2, 71,9, 71,6, 70,9, 70,8, 69,1, 67,3, 66,7, 56,8, 56,1, 55,5, 54,6, 54,0, 50,1, 42,3, 42,1, 42,0, 39,8, 39,5, 39,0, 37,2, 36,8, 36,2, 35,8, 33,2, 32,6, 31,9, 31,9, 31,5, 30,7, 29,7, 29,5, 29,5, 29,3, 29,3, 28,3, 28,2, 28,0, 27,2, 27,2, 26,2, 26,1, 25,8, 25,6, 24,3, 23,8, 22,8, 22,6, 21,0, 19,4, 18,7, 14,1, 11,8 ppm.

[000706] Outros dados de caracterização para os compostos são apresentados na Tabela 7 seguinte.

Tabela 7 - Dados de Caracterização de Lipídeos Catiônicos

Lipídeo	MW esperado	MW observado (M + H)	Rf de TLC	Relação de TLC	Solventes de TLC	TEMPERATURA AMBIENTE de HPLC (min)	HPLC % de pureza	Método
E0001			0,77	4:6	EtOAc:He ptano			
E0002			0,67	1:0	EtOAc:He ptano			
E0003			0,45	1:0	EtOAc:He ptano			
E0004			0,23	1:9	MeOH:DC M			
E0005			0,52	1:9	MeOH:DC M			
E0006			0,64	1:0	EtOAc:He ptano			
E0007			0,80	1:9	MeOH:DC M			
E0008	877,8	879,3						
E0009	935,8	937,3						
E0010	917,8	919,3	0,59	1:9	MeOH:DC M			
E0011	865,8	867,2	0,51	1:19	MeOH:DC M			

Lípídeo		MW esperado	MW observado (M + H)	Rf de TLC	Relação de TLC	Solventes de TLC	TEMPERATURA AMBIENTE de HPLC (min)	HPLC % de pureza	Método
E0012		864,8	865,9	0,10	1:9	MeOH:DC M			
E0013		878,8	880,0	0,40	1:9	MeOH:DC M			
E0014		863,8	864,5				19,3	98,9	*1
E0015		849,8	850,9	0,62	1:9	MeOH:DC M			
E0016		921,8	923,0	0,49	1:9	MeOH:DC M			
E0017		877,8	879,0	0,51	1:9	MeOH:DC M			
E0018		861,8	863,3	0,54	1:9	MeOH:DC M			
E0019		877,8	879,0	0,54	1:9	MeOH:DC M			
E0020		917,8	919,3	0,15	2:1	heptano:E tOAc			
E0021		917,8	919,3	0,46	1:9	MeOH:DC M			
E0022		889,8	891,3	0,54	1:9	MeOH:DC M			
E0023		878,4	879,2	0,44	1:10	MeOH:Et OAc			
E0024		879,8	880,7	0,62	1:9	MeOH:DC M	15,3	99,4	*1
E0025		892,5	893,2	0,31	1:10	MeOH:Et OAc			
E0026		877,8	879,3	0,51	1:9	MeOH:DC M			
E0027		847,8	849,3	0,48	1:9	MeOH:DC M			
E0028		849,8	851,0	0,75	1:9	MeOH:DC M			
E0029		897,8	899,2	0,78	1:9	MeOH:DC M			
E0030		953,8	955,3	0,65	1:9	MeOH:DC			

Lípido	MW esperado	MW observado (M + H)	Rf de TLC	Relação de TLC	Solventes de TLC	TEMPERATURA AMBIENTE de HPLC (min)	HPLC % de pureza	Método
					M			
E0031	882,5	882,7	0,31	1:3	EtOAc:He ptano			
E0032	847,7	849,2	0,43	1:9	MeOH:DC M			
E0033	922,5	923,2	0,53	1:10	MeOH:DC M			
E0034	864,4	865,1	0,30	1:10	MeOH:Et OAc			
E0035	863,8	865,2	0,64	1:9	MeOH:DC M			
E0036	876,4	877,0	0,54	1:10	MeOH:DC M			
E0037	893,8	895,2	0,55	1:9	MeOH:DC M			
E0038	934,8	936,3	0,41	1:9	MeOH:DC M			
E0039	892,8	894,2	0,37	1:9	MeOH:DC M			
E0040	863,8	865,2	0,50	1:9	MeOH:DC M			
E0041	1004,8	1006,3	0,79	1:9	MeOH:DC M			
E0042	979,8	981,1	0,59	1:9	MeOH:DC M			
E0043	864,4	865,2	0,40	1:9	MeOH:DC M			
E0044	892,8	894,1	0,22	1:9	MeOH:DC M			
E0045	865,8	867,1	0,37	1:9	MeOH:DC M			
E0046	878,4	879,1	0,42	1:9	MeOH:DC M			
E0047	892,4	893,0	0,60	1:10	MeOH:DC M			
E0048	863,8	865,2	0,45	1:9	MeOH:DC			

Lípido	MW esperado	MW observado (M + H)	Rf de TLC	Relação de TLC	Solventes de TLC	TEMPERATURA AMBIENTE de HPLC (min)	HPLC % de pureza	Método
					M			
E0049	863,8	865,1	0,45	1:9	MeOH:DC M			
E0050	925,8	927,0	0,33, 0,40 um	1:19	MeOH:DC M			
E0051	847,4	847,9	0,39	1:3:6	MeOH:Et OAc: Heptano			
E0052	863,8	865,1	0,47	1:9	MeOH:DC M			
E0053	863,8	865,1	0,34	1:9	MeOH:DC M			
E0054	907,4	908,0	0,38	1:10	MeOH:DC M			
E0055	907,8	909,0	0,35	1:9	MeOH:DC M			
E0056	908,4	909,1	0,37	1:19	MeOH:DC M			
E0057	878,4	880,0	0,37	1:10	MeOH:DC M			
E0058	908,5	909,0	0,37	1:19	MeOH:DC M			
E0059	864,4	864,9	0,37	1:19	MeOH:DC M			
E0060	964,5	965,0	0,56	4:96	MeOH:DC M	15,3	99,7	*1
E0061	821,8	822,8				5,3	97,3	*2
E0062	837,8	838,6				5,8	99,8	*2
E0063	865,8	866,7				14,2	97,4	*1
E0064	881,8	882,6				6,8	99,7	*3
E0065	865,7	866,7				15,2	97,8	*1
E0066	821,8	822,9				15,2	98,9	*1
E0067	864,4	866,0	0,37	1:19	MeOH:DC M			
E0068	849,8	850,5				15,7	99,5	*1

Lípideo	MW esperado	MW observado (M + H)	Rf de TLC	Relação de TLC	Solventes de TLC	TEMPERATURA AMBIENTE de HPLC (min)	HPLC % de pureza	Método
E0069	847,8	848,5				15,9	100,0	*1
E0070	847,8	848,5				15,9	99,7	*1
E0071	891,8	892,5				15,7	97,8	*1
E0072	891,8	892,5				15,7	99,6	*1
E0073	891,8	892,5				15,7	97,8	*1
E0074	921,8	922,7				20,7	92,2	*1
E0075	891,8	892,5				20,2	99,9	*1
E0076	819,7	820,5				14,9	99,7	*1
E0077	891,8	892,5				15,5	99,7	*1
E0078	893,8	894,7				20,4	97,7	*1
E0079	951,8	952,4				20,1	99,4	*1
E0080	823,7	824,7				15,2	99,8	*1
E0081	909,8	911,5				20,4	97,6	*1
E0082	907,7	909,3				15,5	99,9	*1
E0083	863,8	864,5				15,5	99,8	*1
E0084	951,8	953,5				15,3	97,4	*1
E0085	867,8	868,4				15,2	99,6	*1
E0086	895,8	897,5				15,7	99,3	*1
E0087	835,7	836,5				15,2	99,4	*1
E0088	907,8	908,7				18,0	99,7	*1
E0089	863,8	864,5				15,6	98,2	*1
E0090	907,8	908,7				15,3	99,5	*1
E0091	935,8	936,7				15,7	99,3	*1
E0092	821,7	822,5				17,5	99,8	*1
E0093	893,8	894,7				17,9	99,8	*1
E0094	893,8	894,7				18,0	99,9	*1
E0095	919,8	920,5				21,1	99,8	*1
E0096	919,8	920,5				20,6	96,8	*1
E0097	950,8	951,7				15,4	95,4	*1
E0098	1006,8	1008,6				15,1	97,8	*1
E0099	950,8	951,5				14,7	98,8	*1
E0100	978,8	980,8				14,8	97,7	*1
E0101	962,8	963,6				14,7	98,3	*1
E0102	862,7	863,7				15,1	99,5	*1
E0103	906,8	907,8				14,8	97,6	*1

Lípideo	MW esperado	MW observado (M + H)	Rf de TLC	Relação de TLC	Solventes de TLC	TEMPERATURA AMBIENTE de HPLC (min)	HPLC % de pureza	Método
E0104	919,8	920,5				15,3	99,8	*1
E0105	934,8	935,5				15,0	98,6	*1
E0106	918,8	919,7				15,3	98,5	*1
E0107	949,8	950,8				14,9	99,9	*1
E0108	1006,8	1008,5				15,0	97,9	*1
E0109	953,8	954,7				15,1	99,8	*1
E0110	919,8	920,7				15,0	98,7	*1
E0111	1013,8	1015,6				16,9	95,8	*4
E0112	893,8	894,8				15,2	99,8	*1
E0113	937,8	938,5				15,2	99,6	*1
E0114	909,8	910,5				14,5	99,0	*1
E0115	893,8	894,7				15,4	98,9	*1
E0116	909,8	910,6				15,5	99,2	*1
E0117	893,7	894,5				15,5	99,4	*1
E0118	863,8	865,2	0,47	1:9	MeOH:DC M			
E0119	880,5	880,6	0,84	85:5	Clorofórmi o: MeOH			
E0120	920,5	920,7	0,85	9:1	Clorofórmi o: MeOH			
E0121	880,5	880,1	0,83	95:5	Clorofórmi o: MeOH			
E0122	912,4	912,6	0,66	95:5	DCM:Me OH			
E0123	867,9	868,0	0,36	95:5	DCM:Me OH			
E0124	947,8	948,5	0,84	9:1	Clorofórmi o: MeOH			
E0125	925,8	926,3	0,60	95:5	DCM:Me OH			
E0126	907,8	908,5	0,83	95:5	DCM:Me OH			
E0127	907,8	908,1	0,83	85:15	Clorofórmi o: MeOH			
E0128	881,8	882,5	0,61	95:5	DCM:Me OH			

Lípídeo	MW esperado	MW observado (M + H)	Rf de TLC	Relação de TLC	Solventes de TLC	TEMPERATURA AMBIENTE de HPLC (min)	HPLC % de pureza	Método
E0129	993,8	994,4	0,29	95:5	DCM:Me OH			
E0130	979,8	980,1	0,60	9:1	Clorofórmi o: MeOH	17,0	99,5	*5
E0131	879,8	880,3	0,43	9:1	Clorofórmi o: MeOH			
E0132	922,8	923,0	0,43	9:1	Clorofórmi o: MeOH			
E0133	934,8	935,5	0,44	9:1	Clorofórmi o: MeOH			
E0134	1010,8	1012,2	0,40	95:5	DCM:Me OH			
E0135	936,7	937,4	0,45	9:1	Clorofórmi o: MeOH	16,0	98,4	*6
E0136	964,8	965,5	0,46	9:1	DCM:Me OH	16,3	98,8	*6
E0137	962,8	963,8	0,43	9:1	Clorofórmi o: MeOH	16,8	97,3	*6
E0138	909,8	910,4	0,43	95:5	DCM:Me OH	16,7	99,2	*6
E0139	865,7	866,4	0,43	95:5	DCM:Me OH	11,8	99,1	*7
E0140	923,8	924,5	0,42	95:5	DCM:Me OH	16,2	96,2	*6
E0141	950,8	951,0	0,38	95:5	DCM:Me OH	10,8	99,5	*7
E0142	1008,8	1009,7	0,38	95:5	DCM:Me OH			
E0143	979,8	980,9	0,46	95:5	DCM:Me OH	10,9	95,5	*7
E0144	923,8	925,0	0,47	95:5	DCM:Me OH	10,9	96,1	*7
E0145	1008,8	1010,2	0,38	95:5	DCM:Me OH	10,5	92,1	*7
E0146	909,8	910,8	0,18	50:50	EtOAc:he xano			

Lípideo	MW esperado	MW observado (M + H)	Rf de TLC	Relação de TLC	Solventes de TLC	TEMPERATURA AMBIENTE de HPLC (min)	HPLC % de pureza	Método
E0147	893,8	895,0	0,68	9:1	DCM:Me OH			
E0148	922,8	923,7	0,50	9:1	DCM:Me OH			
E0149	907,8	908,9	0,47	9:1	DCM:Me OH			
E0150	937,8	939,0	0,61	9:1	DCM:Me OH			
E0151	935,8	937,0	0,65	9:1	DCM:Me OH			
E0152	967,8	968,3	0,43	95:5	DCM:Me OH			
E0158	879,8	881,1	0,47	8:2	EtOAc:he ptano			
E0159	879,8	881,0	0,41	8:2	EtOAc:he ptano			
E0160	965,8	967,0				6,9	100,0	*8
E0161	933,8	935,0	0,43	9:1	DCM:Me OH			
E0162	933,8	935,0	0,60	9:1	DCM:Me OH			
E0163	933,8	934,9				4,2	100,0	*8
E0164	921,8	923,0	0,41	9:1	DCM:Me OH			
E0165	921,8	923,0	0,48	9:1	DCM:Me OH			
E0166	948,8	949,5	0,58	9:1	DCM:Me OH			
E0167	881,7	882,9				4,3	100,0	*8
E0168	974,8	975,4	0,58	9:1	DCM:Me OH			
E0169	936,8	938,0	0,46	9:1	DCM:Me OH			
E0170								
E0171								
E0175	910,8	911,5	0,50	9:1	DCM:Me			

Lípídeo	MW esperado	MW observado (M + H)	Rf de TLC	Relação de TLC	Solventes de TLC	TEMPERATURA AMBIENTE de HPLC (min)	HPLC % de pureza	Método
					OH			
E0176	908,8	909,5	0,28	95:5	DCM:Me OH			
E0177	921,8	922,9	0,48	9:1	DCM:Me OH			
E0178	935,8	937,0	0,54	9:1	DCM:Me OH			
E0179	933,8	935,1	0,35	95:5	DCM:Me OH			
E0180	881,8	882,9	0,49	95:5	DCM:Me OH			

^a E0050 é uma mistura de diastereômeros cujos dois componentes diastereoméricos têm diferentes valores de Rf sobre sílica.

[000707] Método usado é como segue onde indicado:

*1 – Zorbax 300SB C3 150 x 4,6, 1 mL/min, água:MeCN peso/TFA a 0,1%, 40 a 100% durante 15 min, 100% durante 5 min, detecção de ELSD.

*2 - Zorbax RX-SIL 250 x 4,6, 0,7 mL/min, hexano:EtOH 4:6, detecção de ELSD.

*3 - Zorbax NH2 250 x 4,6, 1 mL/min, hexano:IPA, 30 a 60% durante 10 min, 60% durante 5 min, detector de ELSD.

*4 - Xbridge C8, 150 x 4,6 mm, 1 mL/min, água:MeCN peso/TFA a 0,1%, 30 a 100% durante 15 min, 100% durante 5 min, detecção de ELSD.

*5 – Zorbax Eclipse XDB-C18 250 x 4,6, 1 mL/min, água:MeCN peso/TFA a 0,1%, 50% durante 5 min, em seguida 50 a 100% durante 5 min, em seguida mantido em 100% durante 12 min, detector de ELSD

*6 – Zorbax Eclipse XDB-C18 250 x 4,6, 1 mL/min, água:MeOH peso/TFA a 0,1%, 50% durante 5 min, em seguida 50 a 100% durante 5 min, em seguida mantido em 100% durante 5 min,

detector de ELSD.

*7 – Zorbax Eclipse XDB-C18 250 x 4,6, 1 mL/min, água:MeOH peso/TFA a 0,1%, 50 a 70% durante 2 min, 70 a 100% durante 3 min, em seguida mantido em 100% durante 5 min, detector de ELSD.

*8 – Acquity BEH Shield RP 18 50 x 2,1, 0,5 mL/min, 65 °C, água:IPA peso/TFA a 0,0125%, 30 a 50% durante 1,5 min, 50 a 75% durante 10,5 min, 75 a 90% durante 0,6 min, em seguida mantido em 90% durante 0,4 min, detector de CAD.

Exemplo 68

Preparação das composições

[000708] É preferido que os compostos da invenção sejam administrados na forma de nanopartículas de lipídeo. Desse modo pse refere que as composições da invenção compreendam nanopartículas de lipídeo que compreendem os compostos da invenção e opcionalmente um ou mais outros componentes de lipídeo.

[000709] Para obter redução de tamanho e/ou para aumentar a homogeneidade de tamanho nas partículas, a pessoa versada pode usar as etapas do método estabelecidas abaixo, experimentando com diferentes combinações. Adicionalmente, a pessoa versada pode usar sonicação, filtração ou outras técnicas de dimensionamento que são usadas em formulações lipossômicas.

[000710] O processo para preparação de uma composição da invenção tipicamente compreende fornecer uma solução aquosa compreendendo um agente biologicamente ativo em um primeiro reservatório, fornecendo um segundo reservatório compreendendo uma solução orgânica dos lipídeo(s) e em seguida misturando a solução aquosa com a solução de lipídeo orgânica. O primeiro reservatório está opcionalmente em comunicação de fluido com o segundo reservatório. A etapa de mistura é opcionalmente seguida por

uma etapa de incubação, uma etapa de filtração, e uma etapa de diluição e/ou concentração.

[000711] Em uma modalidade, o agente biologicamente ativo(s) e/ou o lipídeo(s) está/estão em um tampão adequado. Em uma modalidade, o agente biologicamente ativo(s) está em um tampão aquoso tal como um tampão de citrato. Em uma modalidade, o lipídeo(s) está em um álcool orgânico tal como etanol.

[000712] Em uma modalidade, a etapa de incubação compreende permitir a solução da etapa de mistura descansar em um vaso durante cerca de 0 a cerca de 100 horas (preferivelmente cerca de 0 a cerca de 24 horas) em torno da temperatura ambiente e opcionalmente protegida de luz.

[000713] Em uma modalidade, uma etapa de diluição segue a etapa de incubação. A etapa de diluição pode envolver diluição com tampão aquoso (por exemplo, tampão de citrato) por exemplo, usando um aparato de bombeamento (por exemplo, uma bomba peristáltica).

[000714] Em uma modalidade, a etapa de filtração é ultrafiltração. Em uma modalidade, a ultrafiltração compreende concentração da solução diluída seguida por diafiltração, por exemplo, usando um sistema de bombeamento adequado (por exemplo, aparato de bombeamento tal como uma bomba peristáltica ou equivalente da mesma) em conjunção com uma membrana de ultrafiltração adequada (por exemplo, cartuchos de fibra de GE Hollow ou equivalente).

[000715] O processo deve resultar na formação de nanopartículas de lipídeo. Em uma modalidade, as nanopartículas de lipídeo compreendem o agente biologicamente ativo.

[000716] Em uma modalidade, a etapa de mistura fornece uma fase única clara.

[000717] Em uma modalidade, após a etapa de mistura, o solvente orgânico é removido para fornecer uma suspensão de partículas, em

que o agente biologicamente ativo é encapsulado pelos lipídeo(s), por exemplo, em uma bicamada de lipídeo.

[000718] A seleção de um solvente orgânico tipicamente envolverá a consideração de polaridade de solvente e a facilidade com a qual o solvente pode ser removido nos estágios mais tardios de formação de partícula.

[000719] O solvente orgânico, que é também usado como um agente solubilizante, é preferivelmente em uma quantidade suficiente para fornecer uma mistura de fase única clara de agentes biologicamente ativos e lipídeos.

[000720] O solvente orgânico pode ser selecionado de um ou mais (por exemplo, dois) de clorofórmio, diclorometano, dietiléter, ciclohexano, ciclopentano, benzeno, tolueno, metanol, e outros álcoois alifáticos (por exemplo, C₁ a C₈) tais como etanol, propanol, isopropanol, butanol, terc-butanol, iso-butanol, pentanol e hexanol.

[000721] A etapa de mistura pode ocorrer por qualquer número de métodos, por exemplo, por meios mecânicos tal como um misturador de vórtice.

[000722] Os métodos usados para remover o solvente orgânico tipicamente envolverão diafiltração ou evaporação em pressões reduzidas ou sopro de uma corrente de gás inerte (por exemplo, nitrogênio ou argônio) através da mistura.

[000723] Em outras modalidades, o método também compreende adicionar policações de não lipídeo que são úteis para executar a transformação de células usando as presentes composições. Exemplos de policações de não lipídeo adequadas incluem, porém estão limitadas a, brometo de hexadimetrina (vendido sob o nome registrado POLIBRENE^(R), de Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wis., USA) ou outros sais de hexadimetrina. Outras policações adequadas incluem, por exemplo, sais de poli-L-ornitina, poli-L-arginina,

poli-L-lisina, poli-D-lisina, polialilamina e polietilenoimina.

[000724] Em certas modalidades, a formação das nanopartículas de lipídeo pode ser realizada em um sistema de monofase (por exemplo, uma monofase de Bligh e Dyer ou mistura similar de solventes aquosos e orgânicos) ou em um sistema de duas fases com mistura adequada.

[000725] A nanopartícula de lipídeo pode ser formada em um sistema de mono- ou bifase. Em um sistema de monofase, os lipídeo(s) catiônico(s) e agente biologicamente ativo são cada dissolvidos em um volume da mistura de monofase. A combinação das duas soluções fornece uma única mistura em que os complexos formam-se. Em um sistema de bifase, os lipídeos catiônicos ligam-se ao agente biologicamente ativo (que está presente na fase aquosa), e “extraem”-no na fase orgânica.

[000726] Em uma modalidade, as nanopartículas de lipídeo são preparadas por um método que compreende: (a) contactar o agente biologicamente ativo com uma solução compreendendo lipídeos não catiônicos e um detergente para formar uma mistura de composto-lipídeo; (b) contactar lipídeos catiônicos com a mistura de composto-lipídeo para neutralizar uma porção da carga negativa do agente biologicamente ativo e formar uma mistura de carga neutralizada de agente biologicamente ativo e lipídeos; e (c) remover o detergente da mistura de carga neutralizada.

[000727] Em um grupo de modalidades, a solução de lipídeos neutros e detergente é uma solução aquosa. Contactar o agente biologicamente ativo com a solução de lipídeos neutros e detergente é tipicamente realizado misturando-se uma com a outra uma primeira solução do agente biologicamente ativo e uma segunda solução dos lipídeos e detergente. Preferivelmente, a solução de agente biologicamente ativo é também uma solução de detergente. A

quantidade de lipídeo neutro que é usada no presente método é tipicamente determinada com base na quantidade de lipídeo catiônico usada, e é tipicamente de cerca de 0,2 a 5 vezes a quantidade de lipídeo catiônico, preferivelmente de cerca de 0,5 a cerca de 2 vezes a quantidade de lipídeo catiônico usada.

[000728] A mistura de agente biologicamente ativo-lipídeo desse modo formada é contactada com lipídeos catiônicos para neutralizar uma porção da carga negativa que é associada com a molécula de interesse (ou outros materiais polianiónicos) presente. A quantidade de lipídeos catiônicos usada é tipicamente a quantidade suficiente para neutralizar pelo menos 50% da carga negativa do agente biologicamente ativo. Preferivelmente, a carga negativa será pelo menos 70% neutralizada, mais preferivelmente pelo menos 90% neutralizada.

[000729] Os métodos usados para remover o detergente tipicamente envolvem diálise. Quando solventes orgânicos estão presentes, a remoção é tipicamente realizada por diafiltração ou evaporação em pressões reduzidas ou por sopro de uma corrente de gás inerte (por exemplo, nitrogênio ou argônio) através da mistura.

[000730] É descrito aqui um aparato para a preparação de uma composição da presente invenção. O aparato tipicamente inclui um primeiro reservatório para conter uma solução aquosa compreendendo um agente biologicamente ativo e um segundo reservatório para conter uma solução de lipídeo orgânica. O aparato também tipicamente inclui um mecanismo de bomba configurado para bombear as soluções de lipídeo aquosas e orgânicas em uma região de mistura ou câmara de mistura em taxas de fluxo substancialmente iguais. Em uma modalidade, a região de mistura ou câmara de mistura compreende um acoplamento em T ou equivalente do mesmo, que permite as correntes de fluido aquosas e orgânicas combinarem-se como entrada no conector T e as soluções aquosas e orgânicas

combinadas resultantes saírem do conector T em um reservatório de coleta ou equivalente do mesmo.

Exemplo 69

Método exemplo de preparar composições

[000731] As nanopartículas de lipídeo (LNPs) são formadas misturando-se volumes iguais de lipídeos dissolvidos em álcool com siRNA dissolvido em um tampão de citrato por um processo a jato de choque. A solução de lipídeo contém um composto de lipídeo catiônico da invenção ou um lipídeo comparativo, um lipídeo auxiliar (colesterol), um lipídeo neutro opcional (DSPC) e um lipídeo de PEG (PEG) em uma concentração de 8 a 16 mg/mL com um alvo de 12 mg/mL em um álcool. As relações molares relativas de cada componente de lipídeo nas formulações desta invenção são relatadas nas tabelas 8 até 11. Onde uma formulação de LNP contém quatro componentes de lipídeo, as relações molares correspondem ao tipo de lipídeo como aparece nas primeiras quatro colunas da tabela, na ordem em que eles aparecem. Onde uma formulação de LNP contém três componentes de lipídeo, não existe nenhum lipídeo neutro.

[000732] A relação dos lipídeos varia de 20 a 70 moles percentuais para o lipídeo catiônico com um alvo de 40 a 60, o mol percentual de lipídeo auxiliar varia de 20 a 70 com um alvo de 30 a 50, o mol percentual de lipídeo neutro varia de 0 a 30, o mol percentual de lipídeo de PEG tem uma faixa de 1 a 6 com um alvo de 2 a 5. A concentração de solução de siRNA varia de 0,7 a 1,0 mg/mL com um alvo de 0,8 a 0,9 mg/mL em um tampão de citrato de sódio:cloreto de sódio pH 4. Os LNPs são formados misturando-se volumes iguais de solução de lipídeo em etanol com siRNA dissolvido em um tampão de citrato por um processo a jato de choque através de tubulações com ID variando de 0,25 a 2,0 mm em uma taxa de fluxo total de 10 a 120 mL/min. A solução de LNP misturada é mantida em temperatura ambiente durante 0 a 48 hrs antes de uma

etapa de diluição. A solução é em seguida concentrada e diafiltrada com tampão adequado por processo de ultrafiltração usando membranas com um corte de MW de 30 a 100 KD. O produto final é filtrado estéril e armazenado a 4 °C.

Exemplo 70: Transfecção in vivo em um modelo de camundongo

[000733] Camundongos CD-1 fêmeas são recebidos de Charles River Labs e mantidos em comida de lab padrão e água ad libitum. Os animais pesam aproximadamente 25 gramas no momento da dosagem. siRNA formulado é administrado como uma única dose em vários níveis de dose intravenosamente por meio da veia do rabo lateral calculados em uma base (mg de siRNAs/kg) de acordo com os pesos do animal individuais (10 ml/kg de volume de injeção).

[000734] siRNAs formulados são preparados de sequências de siRNA de filamento duplo específicas para uma sequência de mRNA alvo, e são na forma de partículas de nucleotídeo de lipídeo (LNPs) contendo lipídeos catiônicos, lipídeos furtivos e lipídeo neutros, como fornecido nos exemplos abaixo. A constructo de siRNA para uso no alveamento do fígado é específica para Fator VII. A constructo de siRNA para uso no alveamento de tumores é específica para PLK1-424, que é publicado por Judge e outro, Ver, J Clin Invest. 2009 Mar; 119(3):661-73; doi: 10,1172/JCI37515).

1. sequência duplex de siRNA FVII

5' UUu AAU UGA AAC cAA GAc Auu 3' (SEQ ID NO:1)

5' uGu cuu GGu uuc AAu uAA Auu 3' (SEQ ID NO:2)

2. sequência duplex de siRNA de PLK1-424

5' UAU UUA AgG AGG GUG AuC Uuu 3' (SEQ ID NO:3)

5' AGA Uca cCC Ucc uuA AAU auu 3' (SEQ ID NO:4)

[000735] As seguintes abreviações são usadas nestas sequências:

A = adenosina

U = uridina

G = guanosina

C = citosina

a = 2'-O-metil-adenosina

u = 2'-O-metil-uridina

g = 2'-O-metil-guanosina

c = 2'-O-metil-citosina

Exemplo 71: Ensaio de Atividade de Fator VII

[000736] siRNA Fator VII formulado é administrado como uma única dose em vários níveis de dose intravenosamente por meio da veia do rabo lateral calculados em uma base de mg de siRNAs/kg de acordo com os pesos do animal individuais (10 ml/kg de volume de injeção). Aproximadamente 48h após a injeção, os camundongos são eutanizados por inalação de CO₂ seguido por exsanguinações através da veia cava. O sangue é coletado em tubos contendo anticoagulante de citrato de sódio a 0,105 M para análise de atividade de Fator VII plasmático. Em alguns casos, pequenos pedaços (~50 mg) de fígado são coletados e congelados instantaneamente em nitrogênio líquido para seguir a quantificação de mRNA.

[000737] O plasma coletado de camundongos injetados é ensaiado quanto à atividade de Fator VII usando o *kit* Biophen FVII de Hyphen Biomedical (número do catálogo 221304). Uma curva padrão de ensaio é preparada usando alíquotas de plasma reunidas dos animais de controle de veículo. Todas as amostras são diluídas para incluir-se na faixa linear da curva padrão e uma atividade de Fator VII relativa é relatada.

[000738] Em alguns casos, RNA de fígado total é preparado usando o *kit* de isolamento de RNeasy de Qiagen (número do catálogo 74106) de acordo com o protocolo do fabricante. mRNA de Fator VII é analisado por PCR quantitativa e normalizado para GAPDH. Ensaio de expressão de gene de Fator VII de Applied Biosystems

Mm00487333_m1 e controle endógeno de GAPDH de camundongo número do cat. 4352339E são usados para detecção de mRNA.

[000739] Os resultados para o ensaio de FVII são estabelecidos na seguinte tabela 8.

Tabela 8 – Ensaio de Fator VII – resultados de fígado *in vivo*

Lipídeo	Lipídeo neutro ¹	Lipídeo auxiliar	Lipídeo furtivo ^{2,3}	Relação de lipídeo (relação molar) ⁴	Relação de N/P	Tamanho final (nm)	PDI	pKa	dose (mg/kg)	Inib. % de FVII
E0001	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	71	0,101	4,84	3	27,6
E0001		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	77	0,16	4,84	3	20,1
E0002	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	109	0,221		3	10,4
E0002	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	109	0,221		1	-0,3
E0003	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	106	0,224		3	2,9
E0004		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	186	0,201	7,48	3	41
E0004	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	142	0,113	7,48	3	23,4
E0005		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	146	0,07		1,5	59,9
E0005	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	168	0,069		3	12,2
E0006		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	95	0,142	4,88	3	21,2
E0006	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	146	0,04	4,88	3	15,7
E0007		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	138	0,148	5,84	3	76,8
E0007	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	92	0,178	5,84	3	72,2
E0008	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	85	0,168	5,81	3	73
E0008		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	84	0,214	5,81	3	84,5
E0009		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	82	0,16	4,89	3	6,9
E0009	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	83	0,2	4,89	3	38,4
E0010		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	80	0,201	5,85	3	65,1
E0010	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	90	0,184	5,85	3	46,8
E0011	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	111	0,221	5,32	3	86,5
E0011		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	108	0,23	5,32	3	92,3
E0012	DSPC	CHOL	AVANTI	30/30/36/4	2,3	220	0,105		3	9,3
E0014		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	101,5	0,182	6,4	1	68,5
E0014		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	148	0,05	6,4	3	97,4
E0014	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	104	0,151	6,4	3	98,6
E0014	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	104	0,151	6,4	1	72,1
E0014	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	95	0,148	6,4	3	95,8
E0014		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	94,6	0,092	6,4	3	94
E0014		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	94,6	0,092	6,4	1	37,6
E0014		CHOL	GM-020	60/0/34/6	3	85,8	0,106	6,4	3	96,6
E0014		CHOL	GM-020	60/0/34/6	3	85,8	0,106	6,4	1	25

Lipídeo	Lipídeo neutro ¹	Lipídeo auxiliar	Lipídeo furtivo ^{2,3}	Relação de lipídeo (relação molar) ⁴	Relação de N/P	Tamanho final (nm)	PDI	pKa	dose (mg/kg)	Inib. % de FVII
E0014		CHOL	GM-020	60/0/38/2	3	141	0,122	6,4	3	96,2
E0014		CHOL	GM-020	60/0/38/2	3	141	0,122	6,4	1	71,5
E0015		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	130	0,05	7,39	3	77,1
E0015	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	164	0,06	7,39	3	30,7
E0016		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	178	0,206	5,85	3	59,9
E0016	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	97	0,175	5,85	3	88,8
E0017		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	97	0,19	6,46	3	96,5
E0017	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	106	0,17	6,46	3	98,3
E0017	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	106	0,17	6,46	1	53,8
E0018	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	119	0,095	5,9	3	91,8
E0018		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	103	0,113	5,9	3	98
E0018		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	140	0,13	5,9	1	40,5
E0019	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	143	0,065	6,75	3	76,7
E0019		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	90,5	0,164	6,75	3	85,2
E0019		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	180	0,19	6,75	1	33,7
E0020		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	81	0,084	6,08	3	51,4
E0020	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	83	0,138	6,08	3	62,4
E0021		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	72	0,184	5,13	3	52,8
E0021	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	85	0,22	5,13	3	24,5
E0022		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	84	0,192		3	87,8
E0022	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	93	0,143		3	49,4
E0023		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	99	0,122	5,85	3	68
E0023	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	95	0,221	5,85	3	59,1
E0024		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	149	0,092	6,62	3	99,5
E0024	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	100	0,148	6,62	3	99,9
E0024	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	100	0,148	6,62	1	85,3
E0024		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	125	0,08	6,62	1	95,7
E0024		CHOL	S010	60/0/37/3	3	96,09	0,137	6,62	1	72,2
E0024		CHOL	S006	60/0/37/3	3	98,53	0,12	6,62	1	83,8
E0025		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	73	0,12	5,45	3	94,2
E0025	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	97	0,22	5,45	3	63
E0026		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	87	0,23	5,85	3	95,1
E0027		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	65	0,15	5,71	3	30,3
E0027	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	146	0,311	5,71	3	36,3
E0028		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	68	0,125	4,8	3	38,7
E0028	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	129	0,216	4,8	3	12,5
E0029		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	113	0,08	4,95	3	-19,1
E0029	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	137	0,04	4,95	3	12,4

Lipídeo	Lipídeo neutro ¹	Lipídeo auxiliar	Lipídeo furtivo ^{2,3}	Relação de lipídeo (relação molar) ⁴	Relação de N/P	Tamanho final (nm)	PDI	pKa	dose (mg/kg)	Inib. % de FVII
E0030		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	155	0,08	5,38	3	12,4
E0031		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	65	0,11	4,8	3	27,1
E0031	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	108	0,23	4,8	3	36,7
E0032		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	63	0,21	6,8	3	85,5
E0032	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	87	0,18	6,8	3	64,5
E0033		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	105	0,05		3	15,3
E0033	DSPC	CHOL	AVANTI	25/28/18/4	1,9	161	0,16		3	-36,4
E0034		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	99	0,16		3	88,1
E0034	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	99	0,16		3	81,3
E0035		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	79	0,21	5,93	3	66,8
E0035	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	103	0,2	5,93	3	22
E0036		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	76	0,24	5,74	3	-23,1
E0036	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	122	0,12	5,74	3	-47
E0037		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	117	0,1		3	66,2
E0037	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	96	0,24		3	69,3
E0038		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	115	0,08		3	-6,2
E0038	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	116	0,25		3	-2,4
E0039		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	94	0,06	5,88	3	-5,4
E0039	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	113	0,15	5,88	3	-6,7
E0040	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	87	0,21	6,13	3	91,8
E0040		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	103	0,15	6,13	3	97,8
E0040		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	101	0,17	6,13	1	49,2
E0041		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	93	0,21	4,8	3	17,6
E0041	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	95	0,37	4,8	3	-7,4
E0042		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	73	0,19	6,7	3	84,5
E0042	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	83	0,11	6,7	3	49,1
E0043	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	110	0,24	6,33	3	95,7
E0043		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	76	0,15	6,33	3	-11,7
E0045	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	100	0,18	4,73	3	10,4
E0045		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	103	0,25	4,73	3	90,7
E0046		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	194	0,116	5,75	3	12,7
E0047		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	112	0,061	5,55	3	-3,4
E0048		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	225	0,115	6,56	3	88,5
E0049		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	237	0,09	6,85	3	78,8
E0050	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	100	0,21	4,9	3	-7,2
E0050		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	103	0,097	4,9	3	-10,4
E0051		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	142,9	0,057	5,73	3	77,5
E0051	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	157,7	0,131	5,73	3	17

Lipídeo	Lipídeo neutro ¹	Lipídeo auxiliar	Lipídeo furtivo ^{2,3}	Relação de lipídeo (relação molar) ⁴	Relação de N/P	Tamanho final (nm)	PDI	pKa	dose (mg/kg)	Inib. % de FVII
E0052	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	100,4	0,185	6,95	3	98,1
E0052	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	100,4	0,185	6,95	1	69,8
E0053	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	103,3	0,221	6,95	3	90,1
E0053	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	103,3	0,221	6,95	1	-9,4
E0054	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	103	0,2	6,58	3	97,8
E0054		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	96	0,13	6,58	3	98,9
E0054	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	103	0,2	6,58	1	57,5
E0054		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	96	0,13	6,58	1	63
E0055	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	113	0,24	6,78	3	96,4
E0055		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	380	0,22	6,78	3	69,8
E0055	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	113	0,24	6,78	1	28,2
E0055		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	380	0,22	6,78	1	14,8
E0060		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	90,25	0,171	6,43	1	0,0
E0061		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	139,4	0,073	6,28	1	52,6
E0062		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	145,1	0,125	6,45	1	64,8
E0063		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	155,5	0,09	6,48	1	33,3
E0064		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	169,2	0,144	6,83	1	37,2
E0065		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	153,01	0,148	6,8	1	41,1
E0066		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	140,7	0,071	6,5	1	44,2
E0068		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	174,0	0,041	4,82	1	28,6
E0069		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	113,4	0,199	6,07	1	29
E0070		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	150,9	0,045	6,40	1	50,3
E0071		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	188,2	0,151	6,47	1	30,8
E0073		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	130,1	0,118	5,66	1	37,4
E0075		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	108,3	0,098	5,79	1	31,5
E0076		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	89,47	0,143	5,85	1	29,3
E0077		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	109,8	0,127	5,79	1	26,8
E0078		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	122,6	0,098	5,72	1	51,9
E0079		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	106,2	0,052	6,79	1	33,5
E0082		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	105,1	0,303	6,81	1	49,7
E0083		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	113,4	0,199	6,79	1	55,6
E0084		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	112,1	0,1	7,27	1	60,7
E0087		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	119,2	0,148	6,38	1	69
E0088		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	110,7	0,080	5,79	1	50,8
E0094		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	115,5	0,076	5,91	1	36,3
E0095		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	125,1	0,091	5,84	1	13
E0096		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	128,8	0,162	5,77	1	14,4
E0115		CHOL	GM-020	60/0/36/4	3	162,5	0,098	6,41	1	68,8

Lipídeo	Lipídeo neutro ¹	Lipídeo auxiliar	Lipídeo furtivo ^{2,3}	Relação de lipídeo (relação molar) ⁴	Relação de N/P	Tamanho final (nm)	PDI	pKa	dose (mg/kg)	Inib. % de FVII
E0118	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	88	0,21	6,88	3	98,1
E0118		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	93	0,23	6,88	3	99,2
E0118		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	98	0,22	6,88	1	76,1
E0170		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	170	0,05		3	14,3
E0170	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	133	0,095		3	9,3
E0171		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	90	0,18	5,85	3	54,1
E0172		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	129	0,184	8,5	3	40,8
E0172	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	170	0,181	8,5	3	21
E0173		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	76	0,16	6,73	3	98,5
E0173	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	98	0,17	6,73	3	90,9
E0173		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	76	0,16	6,73	1	87,4
E0174	DSPC	CHOL	AVANTI	50/28/18/4	3,43	117	0,23	5,15	3	63,2
E0174		CHOL	AVANTI	50/0/46/4	3,43	90	0,21	5,15	3	3,5

¹ em que uma célula vazia indica que nenhum lipídeo neutro está presente

² em que AVANTI representa AVANTI 880150P

³ em que GM-020 representa GM-020 NOF

⁴ em que a ordem dos tipos de lipídeos como eles aparecem na relação molar corresponde à ordem em que os lipídeos aparecem nas primeiras quatro colunas da tabela. Onde apenas três lipídeos são listados na relação molar, o lipídeo neutro está ausente.

Exemplo 72: Estudos de Tumor Hep3B

[000740] Tumores Hep3B são estabelecidos em camundongos nus fêmeas por injeção sc de 7×10^6 células em 100 μ l de PBS no flanco esquerdo. Os camundongos são randomizados em grupos de tratamento 10 a 14 dias após a semeadura quando os tumores alcançaram um tamanho médio de 100 mm³. Formulações de LNP formuladas com siRNA são administradas em vários níveis de dose intravenosamente por meio da veia do rabo lateral calculados em uma base de mg de siRNAs/kg de acordo com os pesos do animal individuais (10 ml/kg de volume de injeção). Os camundongos são

eutanizados por inalação de CO₂ em vários pontos do tempo e os tumores são colhidos para quantificação de mRNA. Os lipídeos com uma ampla faixa de pKa (5,3 a 6,6) são usados nas formulações de LNP. Os tumores são medidos em 2 dimensões (largura x altura) para estimar o crescimento do tumor usando calibradores digitais. O volume do tumor é calculado usando a equação $[a \times b \times b/2]$, onde **a** iguala-se ao maior diâmetro e **b** iguala-se ao menor diâmetro.

Exemplo 73: Estudos de tumor de fígado HepG2

[000741] Tumores HepG2 são estabelecidos em camundongos nus fêmeas por injeção sc de 5×10^6 células em 100 µl de PBS no flanco esquerdo. Os camundongos são randomizados em grupos de tratamento 10 a 14 dias após a semeadura quando os tumores alcançaram um tamanho médio de 150 mm³. Formulações de LNP formuladas com siRNA são administradas em 3x3 mg/kg de níveis de dose intravenosamente por meio da veia do rabo lateral calculados em uma base de mg de siRNAs/kg de acordo com os pesos do animal individuais (10 ml/kg de volume de injeção). Os camundongos são eutanizados por inalação de CO₂ em vários pontos do tempo e os tumores são colhidos 24 hrs após a última dose para quantificação de mRNA. Os lipídeos com uma ampla faixa de pKa (5,3 a 6,6) são usados nas formulações de LNP. Os tumores são medidos em 2 dimensões (largura x altura) para estimar o crescimento do tumor usando calibradores digitais. O volume do tumor é calculado usando a equação $[a \times b \times b/2]$, onde **a** = o maior diâmetro e **b** = o menor diâmetro.

Exemplo 74: Estudos de tumor renal 786-0

[000742] Tumores 786-0 são estabelecidos como descrito antes por injeção sc de 10×10^6 células em 200 µl de PBS. 4 semanas após a implantação, os camundongos com o tamanho de tumor variando de 200 a 250 mm³ são randomizados em grupos de tratamento. LNPs

formuladas com siRNA são em seguida intravenosamente administradas em níveis de dose de 5 ou 10 mg/kg. 48 hrs após a única dose, os tumores são coletados para quantificação de mRNA.

Exemplo 75: Medição de PLK-1 e GAPDH mRNA KD em tecidos de tumor

[000743] Cerca de 30 a 50 mg de tecido de tumor são homogenizados em tampão de lise de tecido em um homogenizador Qiagen seguido por centrifugação para clarificar os lisados. RNA total é isolado usando o *kit* de isolamento RNeasy (número do catálogo 74106) de acordo com o protocolo do fabricante. PLK-1 mRNA é analisado por PCR quantitativa e normalizado para GAPDH humano. Ensaio de expressão de gene de PLK-1 humano de Applied Biosystems Hs00983229_m1 e controle endógeno de GAPDH humano número do cat. 4326317E são usados para detecção de mRNA.

[000744] Os resultados para redução ("KD") de mRNA de níveis de PLK1 nos experimentos de tumor dos exemplos 72, 73, 74 e 75 são estabelecidos nas seguintes tabelas e calculados como porcentagem de inibição (% de inibição de PLK1). Os resultados para alvejamento de tumores de fígado Hep3B são relatados na tabela 9. Os resultados para alvejamento de tumores de fígado HepG2 são relatados na tabela 10. Os resultados para alvejamento de tumores renais 786-0 são relatados na tabela 11. O pKa em todas as tabelas se refere ao pKa do lipídeo catiônico. Onde múltiplas doses são indicadas (por exemplo, 3 x 5), o primeiro número indica o número de doses fornecidas e o segundo número indica a quantidade por dose em mg de siRNA (agente biologicamente ativo) por kg de camundongo. Em geral, as múltiplas doses são administradas em intervalos de 24 horas, e os tecidos para quantificação de mRNA são colhidos 24 horas após a última dose.

Tabela 9 – Resultados de ensaio *in vivo* de tumor Hep3B

Lípido Ref.	Lípido auxiliar	Lípido neutro ¹	Lípido furtivo	Relação de lípido (relação molar) ²	N/P (relação)	Tamanho final (nm)	pKa	# doses x (mg/kg)	Inibição % de PLK1
E0008	Chol		S011	60/38/2	4	93,11	5,81	1x5	85
E0008	Chol		S004	60/38/2	4	123,1	5,81	1x1	38
E0011	Chol	DSPC	S011	40/48/10/2	4	83,45	5,32	1x10	56
E0011	Chol		S019	60/38/2	4	110	5,32	1x1	36
E0011	Chol		S020	60/38/2	4	74,42	5,32	1x1	32
E0011	Chol		S011	60/38/2	4	84,58	5,32	1x10	67
E0011	Chol		S011	60/38/2	4	84,58	5,32	3x10	71
E0011	Chol		S011	60/38/2	4	84,58	5,32	3x5	68
E0011	Chol	DSPC	S004	40/48/10/2	4	85,09	5,32	1x10	65
E0011	Chol	DSPC	S012	40/48/10/2	4	91,46	5,32	1x10	18
E0011	Chol	DSPC	S002	40/48/10/2	4	89,73	5,32	1x10	37
E0011	Chol	DSPC	S003	40/48/10/2	4	100,5	5,32	1x10	42
E0011	Chol	DSPC	S011	40/53/5/2	4	100	5,32	1x10	60
E0011	Chol	DSPC	S011	40/43/15/2	4	94,21	5,32	1x10	44
E0011	Chol	DSPC	S011	40/38/20/2	4	95,4	5,32	1x10	38
E0011	Chol		S011	60/38/2	4	83,01	5,32	1x5	69
E0011	Chol		S011	60/38/2	4	83,02	5,32	1x2	46
E0011	Chol		S004	60/38/2	4	95,47	5,32	1x10	70
E0011	Chol		S004	60/38/2	4	95,47	5,32	3x5	67
E0011	Chol		S004	60/38/2	4	96,31	5,32	1x2	56
E0011	Chol		S004	60/38/2	4	96,31	5,32	1x5	66
E0011	Chol		S007	60/38/2	4	94,2	5,32	1x2	65
E0011	Chol		S009	60/38/2	4	98,41	5,32	1x2	64
E0011	Chol		S008	60/38/2	4	101,5	5,32	1x2	60
E0011	Chol		S005	60/38/2	4	95,26	5,32	1x2	52
E0011	Chol		S011	55/43/2	4	84,58	5,32	1x2	59
E0011	Chol		S011	55/43/2	4	84,58	5,32	1x5	66
E0011	Chol		S011	50/48/2	4	84,76	5,32	1x2	58
E0011	Chol		S011	50/48/2	4	84,76	5,32	1x5	67
E0014	Chol	DSPC	S011	40/48/10/2	4	82,21	6,4	1x10	22
E0061	Chol		S004	60/38/2	4	90,09	6,28	1x1	23
E0024	Chol	DSPC	S011	40/48/10/2	3	88,46	6,62	1x10	15
E0024	Chol		S004	60/38/0/2	3	120,6	6,62	4x5	23
E0025	Chol		S011	60/38/2	4	95,73	5,45	1x5	84
E0025	Chol	DSPC	S011	40/48/10/2	4	85,63	5,45	1x5	77
E0025	Chol	DSPC	S004	45/43/10/2	4	118,8	5,45	1x1	27
E0026	Chol		S011	60/38/2	4	105,8	5,85	1x5	75

Lípideo Ref.	Lípideo auxiliar	Lípideo neutro ¹	Lípideo furtivo	Relação de lípideo (relação molar) ²	N/P (relação)	Tamanho final (nm)	pKa	# doses x (mg/kg)	Inibição % de PLK1
E0051	Chol	DSPC	S011	40/48/10/2	4	85,77	5,73	1x10	17
E0095	Chol		S004	50/48/2	4	96,09	5,84	1x1	58
E0095	Chol		S004	50/48/2	4	96,09	5,84	1x0,1	23
E0095	Chol		S004	50/48/2	4	96,09	5,84	1x1	56
E0075	Chol		S011	60/38/2	4	124,5	5,79	1x5	75
E0076	Chol		S011	60/38/2	4	89,89	5,85	1x5	85
E0076	Chol		S004	50/48/2	4	86,03	5,85	1x1	54
E0076	Chol		S004	50/48/2	4	86,03	5,85	1x1	42
E0076	Chol	DSPC	S004	45/43/10/2	4	80,98	5,85	1x1	19
E0076	Chol	DSPC	S004	45/43/10/2	4	80,98	5,85	1x0,1	0
E0077	Chol		S011	60/38/2	4	120,8	5,79	1x5	77
E0085	Chol	DSPC	S004	45/43/10/2	4	76,8	5,32	1x1	22
E0085	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	4	87,74	5,32	1x1	30
E0085	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	4	87,74	5,32	1x1	34
E0085	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	4	87,74	5,32	1x0,1	53
E0085	Chol		S004	50/48/0/2	4	96,42	5,32	1x1	42
E0085	Chol	DSPC	S004	50/38/10/2	4	88,33	5,32	1x1	20
E0085	Chol	DSPC	S011	40/48/10/2	4	81,83	5,32	1x10	55
E0085	Chol		S004	60/38/2	4	90,06	5,32	1x2	62
E0085	Chol		S004	60/38/2	4	90,06	5,32	1x5	69
E0088	Chol		S011	60/38/2	4	146,2	5,79	1x5	71
E0093	Chol	DSPC	S011	40/48/10/2	4	82,42	4,85	1x10	2
E0104	Chol	DSPC	S004	45/43/10/2	4	87,59	6,1	1x1	48
E0104	Chol	DSPC	S004	45/43/10/2	4	87,59	6,1	1x0,1	34
E0104	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	4	92,19	6,1	1x1	34
E0104	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	4	92,19	6,1	1x0,1	22
E0104	Chol		S004	60/38/2	4	106,2	6,1	1x1	47
E0104	Chol		S004	50/48/2	3	96,19	6,1	1x1	48
E0104	Chol		S020	50/48/2	4	75,56	6,1	1x1	45
E0104	Chol		S004	50/48/2	4	90,77	6,1	1x0,1	29
E0104	Chol		S004	50/48/2	4	90,77	6,1	1x1	55
E0104	Chol		S004	50/48/2	4	95,05	6,1	1x1	50
E0104	Chol		S004	50/48/2	4	95,05	6,1	1x0,1	15
E0104	Chol		S004	50/48/2	4	95,05	6,1	1x1	50
E0104	Chol		S004	50/48/2	4	95,05	6,1	1x1	40
E0104	Chol		S004	50/48/2	4	90,87	6,1	1x1	56
E0102	Chol		S004	60/38/2	4	94,69	6,31	1x1	37
E0102	Chol		S004	60/38/2	4	94,69	6,31	1x1	47

Lípídeo Ref.	Lípídeo auxiliar	Lípídeo neutro ¹	Lípídeo furtivo	Relação de lípídeo (relação molar) ²	N/P (relação)	Tamanho final (nm)	pKa	# doses x (mg/kg)	Inibição % de PLK1
E0045	Chol		S004	60/38/2	4	103,2	4,73	1x1	36
E0119	Chol		S004	50/48/2	4	99,37	5,82	1x1	40
E0120	Chol		S004	50/48/2	4	87	5,48	1x1	28
E0125	Chol		S004	50/48/2	4	94,13	5,53	1x1	36
E0125	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	4	92,84	5,53	1x1	20
E0125	Chol	DSPC	S004	50/38/10/2	4	101,5	5,53	1x1	34
E0128	Chol		S004	50/48/2	4	83,47	5,01	1x1	23
E0151	Chol		S004	50/48/2	4	103,8	6,06	1x1	25
E0151	Chol		S004	50/48/2	4	103,8	6,06	1x0,1	7
E0152	Chol		S004	50/48/2	4	121,3	5,38	1x1	18
E0160	Chol		S004	50/48/2	4	100,8	6,05	1x1	38
E0161	Chol		S004	50/48/2	4	101,4	6,3	1x1	45
E0167	Chol		S004	50/48/2	4	86,57	5,21	1x1	23
E0175	Chol		S004	60/38/2	4	78,74	5,67	1x1	42
E0175	Chol		S020	60/38/2	4	69,33	5,67	1x1	44
E0175	Chol		S004	50/48/2	4	67,98	5,67	1x1	41
E0175	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	3,8	93,51	5,67	1x1	46
E0175	Chol	resorcino ³	S004	50/43/5/2	3,8	104,2	5,67	1x1	34
E0176	Chol		S004	60/38/2	4	99,14	5,56	1x1	36
E0177	Chol		S004	50/48/2	4	91,91	6,1	1x1	41
E0177	Chol		S004	50/48/2	4	91,91	6,1	1x1	30
E0177	Chol		S004	50/48/2	4	91,91	6,1	1x0,1	9
E0177	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	4	95,92	6,1	1x1	45
E0177	Chol	DOPC	S004	50/43/5/2	4	89,78	6,1	1x1	0
E0177	Chol	DSPC	S004	50/38/10/2	4	88,15	6,1	1x1	36
E0178	Chol		S004	50/48/2	4	88,39	5,92	1x1	35
E0178	Chol		S004	50/48/2	4	88,39	5,92	1x0,1	0
E0178	Chol		S004	50/48/2	4	88,39	5,92	1x1	56
E0178	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	4	94,67	5,92	1x1	58
E0178	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	4	94,67	5,92	1x1	32
E0179	Chol		S004	50/48/2	4	114,6	5,95	1x1	53
E0180	Chol		S004	50/48/2	4	77,35		1x1	16

¹ uma célula vazia indica que o lípídeo neutro é omitido.

² em que a ordem dos tipos de lípídeos como eles aparecem na relação molar corresponde à ordem em que os lípídeos aparecem nas primeiras quatro colunas da tabela. Onde apenas três

lipídeos são listados na relação molar, o lipídeo neutro está ausente.

³ em que “resorcinol” representa 5-heptadecilbenzeno-1,3-diol.

Tabela 10 – Resultados de ensaio *in vivo* de tumor HepG2

Lipídeo Ref.	Lipídeo auxiliar	Lipídeo neutro ¹	Lipídeo furtivo	Relação de lipídeo molar ²	Relação de N/P	Tamanho final	pKa	# doses X (mg/kg)	% de inibição de PLK1
E0011	Chol		S018	60/38/2	4	113,2	5,32	3x3	16
E0011	Chol		S019	60/38/2	4	110	5,32	3x3	13
E0011	Chol		S020	60/38/2	4	74,42	5,32	3x3	29
E0056	Chol		S004	50/48/2	4	77	6,33	3x3	0
E0076	Chol		S004	50/48/2	4	86,03	5,85	3x3	35
E0085	Chol	DSPC	S004	45/43/10/2	4	76,8	5,32	3x3	40
E0056	Chol		S004	50/48/2	4	96,09	5,84	3x3	16
E0056	Chol		S004	50/48/2	4	96,09	5,84	3x3	30
E0096	Chol		S004	50/48/2	4	94,91	5,77	3x3	17
E0104	Chol	DSPC	S004	45/43/10/2	4	87,59	6,1	3x3	32
E0104	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	4	92,19	6,1	3x3	36
E0104	Chol	DOPC	S004	50/43/5/2	4	125,1	6,1	3x3	19
E0104	Chol		S004	50/48/2	4	95,05	6,1	3x3	34
E0104	Chol		S004	50/48/2	4	90,87	6,1	3x3	30
E0119	Chol		S004	50/48/2	4	99,37	5,82	3x3	22
E0175	Chol		S004	60/38/2	4	78,74	5,67	3x3	49
E0175	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	3,8	93,51	5,67	3x3	30
E0176	Chol		S004	60/38/2	4	99,14	5,56	3x3	37
E0177	Chol		S004	50/48/2	4	91,91	6,1	3x3	30
E0177	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	4	95,92	6,1	3x3	44
E0177	Chol	DOPC	S004	50/43/5/2	4	89,78	6,1	3x3	24
E0178	Chol	DSPC	S004	50/43/5/2	4	94,67	5,92	3x3	0
E0161	Chol		S004	50/48/2	4	101,4	6,3	3x3	0
E0162	Chol		S004	50/48/2	4	114,4	6,07	3x3	0
E0180	Chol		S004	50/48/2	4	77,35		3x3	0

¹ uma célula vazia indica que o lipídeo neutro é omitido.

² em que a ordem dos tipos de lipídeos como eles aparecem na relação molar corresponde à ordem em que os lipídeos aparecem nas primeiras quatro colunas da tabela. Onde apenas três lipídeos são listados na relação molar, o lipídeo neutro está ausente.

Tabela 11 – Resultados de ensaio de tumor renal 786-0

Lipídeo ref.	Lipídeo auxiliar	Lipídeo neutro ¹	Lipídeo furtivo	Relação de lipídeo ²	Relação N/P	Tamanho final	pKa	# doses X (mg/kg)	% de Inibição de PLK1
E0104	Chol		S004	50/48/2	4	95,05	6,1	1 x 5	55
E0104	Chol	DSPC	S004	45/43/10/2	4	87,59	6,1	1 x 10	50
E0104	Chol		S004	50/48/2	4	95,05	6,1	1 x 10	50

¹ uma célula vazia indica que o lipídeo neutro é omitido.

² em que a ordem dos tipos de lipídeos como eles aparecem na relação molar corresponde à ordem em que os lipídeos aparecem nas primeiras quatro colunas da tabela. Onde apenas três lipídeos são listados na relação molar, o lipídeo neutro está ausente.

[000745] Nas tabelas acima, a relação de N/P é igual à seguinte: (número de moles de lipídeo catiônico inicialmente formulado)/(número de moles de siRNA inicialmente formulado * número total de cargas aniônicas por siRNA).

Exemplo 76: Otimização de formulações de lipídeo

[000746] Outra otimização das formulações utilizando lipídeos catiônicos e lipídeos furtivos, por exemplo, como mostrado nas tabelas acima, é considerada dentro do conhecimento de um prático versado e pode ser feita sem experimentação indevida. Por exemplo, as formulações podem ser otimizadas para pelo menos um parâmetro incluindo, porém não limitado à seleção individual de, por exemplo, o pKa do lipídeo catiônico otimizado para o tipo de célula ou órgão que está sendo alvejado, o lipídeo catiônico usado, o lipídeo furtivo usado, o lipídeo auxiliar, o lipídeo neutro usado, se o lipídeo neutro estiver presente ou ausente, a relação do lipídeo auxiliar, lipídeo neutro opcional, lipídeo furtivo e lipídeo catiônico selecionados, a relação de N/P, os tamanho de partícula, o regime de dosagem, a dose administrada, o método de formulação, e similares.

[000747] Em uma modalidade, quando escolhendo o lipídeo neutro mais ideal, um prático versado mais frequentemente optaria por DSPC

do que DOPC. Em algumas modalidades, por exemplo, para E0177 na tabela 9 e E0104 na tabela 10, as composições que se diferiram apenas pela escolha destes dois lipídeos neutros exibem um KD menor ou mesmo KD zero quando DOPC é usado comparado a quando DSPC é usado, com todos os outros aspectos considerados iguais. Em certas composições, omitindo o lipídeo neutro totalmente, por exemplo, para pelo menos uma formulação de E0085 na tabela 9, resulta em uma porcentagem de inibição maior de PLK1 comparado a tendo um lipídeo neutro presente, ou para E0011 onde progressivamente diminuindo a quantidade de DSPC nas formulações resulta em porcentagem de redução progressivamente crescente.

[000748] A dose em mg/kg e regime de dosagem, por exemplo, número de doses fornecidas e momento das referidas doses, podem também ser otimizados. Por exemplo, em um experimento mostrado na tabela 9, administrando 0,1 mg/kg de uma formulação com E0178 resulta em zero (0) % de KD porém administrando 1,0 mg/kg fornece 35% de KD. Se doses maiores não forem toleradas por um indivíduo, um regime de tratamento completo pode ser administrado como múltiplas doses menores fornecidas durante vários dias, tal como na tabela 9, em que a liberação de 1x10 mg/kg de siRNA *versus* 3x5 mg/kg de siRNA em formulações contendo E0011 e S004 resultou em 70% de KD e 67% de KD, respectivamente.

Exemplo 77: Lipossomas para liberação de réplicons de ácido nucleico

[000749] Vários réplicons de ácido nucleico, cada qual cerca de 10.000 nucleotídeos de comprimento, são liberados em lipossomas como descrito abaixo. Ácido nucleico é encapsulado em lipossomas feitas essencialmente pelos métodos de Jeffs e outro (2005) *Pharmaceutical Research* 22 (3):362-372 e Maurer e outro (2001) *Biophysical Journal*, 80: 2310-2326.

[000750] Lipossomas de referência são feitas de 10% de DSPC

(zwitteriônico, isto é, lipídeo neutro), 40% de DlinDMA (lipídeo catiônico), 48% de colesterol (lipídeo auxiliar) e 2% de DMG conjugado a PEG (lipídeo furtivo). O lipídeo DlinDMA (1,2-dilinoleilóxi-N,N-dimetil-3-aminopropano) é sintetizado usando o procedimento de Heyes e outro (2005) *J Controlled Release* 107:276-87. DSPC (1,2-Diastearoil-sn-glicero-3-fosfocolina) é adquirido de Genzyme. Colesterol é obtido de Sigma-Aldrich. DMG conjugado a PEG (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metóxi(polietileno glicol), sal de amônio), DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano, sal de cloreto) e DC-chol(cloridrato de 3 β -[N-(N',N'dimetil aminoetano)-carbamoil]colesterol) são disponíveis de Avanti Polar Lipids.

[000751] Resumidamente, os lipídeos são dissolvidos em etanol (2 ml), o réplicon é dissolvido em tampão (2 ml, 100 mM de citrato de sódio, pH 6) e estes são misturados com 2 ml de tampão seguido por 1 hora de equilíbrio. A mistura é diluída com 6 ml de tampão em seguida filtrada. O produto resultante continha lipossomas, com ~95% de eficiência de encapsulação.

[000752] A porcentagem de ácido nucleico encapsulado e a concentração de ácido nucleico são determinadas com um *kit* comercial. As lipossomas são diluídas 10x ou 100x em tampão 1X TE (de *kit*) antes da adição da tintura. Separadamente, as lipossomas são diluídas 10x ou 100x em tampão 1X TE contendo Triton X a 0,5% antes da adição da tintura (para romper as lipossomas e desse modo ensaiar o ácido nucleico total). Por conseguinte, uma quantidade igual de tintura é adicionada a cada solução e em seguida aproximadamente 180 μ L de cada solução após a adição de tintura são carregados em duplicata em uma placa de cultura de 96 cavidades. A fluorescência (Ex 485 nm, Em 528 nm) é lida em uma leitora de microplaca.

[000753] Para estimar a expressão *in vivo* do ácido nucleico, uma enzima repórter (SEAP; fosfatase alcalina secretada) é codificada no

réplicon. Níveis de expressão são medidos em soros diluídos 1:4 em tampão de diluição 1X Fosfa-Light usando um substrato de fosfato alcalino quimioluminescente. Camundongos BALB/c de 8 a 10 semanas de idade (5/grupo) são injetados intramuscularmente no dia 0, 50 µl por perna com 0,1 µg ou 1 µg de dose de ácido nucleico. O mesmo vetor é também administrado sem as lipossomas (em PBS) a 1 µg.

[000754] A encapsulação aumenta os níveis de SEAP por cerca de $\frac{1}{2}$ log na dose de 1 µg, e no dia 6 a expressão de uma dose encapsulada de 0,1 µg iguala-se aos níveis observados com a dose não encapsulada de 1 µg. Desse modo, a expressão aumenta quando o ácido nucleico é formulado nas lipossomas relativo ao controle de ácido nucleico nu, mesmo em uma dose menor de 10x.

[000755] Outros experimentos de SEAP mostram uma resposta à dose clara *in vivo*, em que a expressão é observada após a liberação de tão pouco quanto 1 ng de ácido nucleico. Os experimentos comparando a expressão de réplicons encapsulados e nus indicam que 0,01 µg de ácido nucleico encapsulado é equivalente a 1 µg de ácido nucleico nu. Em uma dose de 0,5 µg de ácido nucleico, o material encapsulado pode fornecer uma expressão 12 vezes maior no dia 6; em uma dose de 0,1 µg os níveis podem ser 24 vezes maiores no dia 6.

[000756] Como uma alternativa ao uso do lipídeo de referência (DlinDMA), lipídeos catiônicos da invenção são usados. As lipossomas de referência são formadas usando DlinDMA (ver acima) como o lipídeo catiônico. DlinDMA é substituído com vários lipídeos catiônicos em série como descrito abaixo e mostrado na tabela. Dois tipos diferentes de cada lipossoma são formados, usando 2% de PEG2000-DMG com (01) 40% do lipídeo catiônico, 10% de DSPC, e 48% de colesterol, ou (02) 60% do lipídeo catiônico e 38% de colesterol. Desse modo uma comparação das lipossomas (01) e (02) mostra o efeito do lipídeo zwitteriônico neutro.

[000757] Estas lipossomas são testadas com o repórter SEAP descrito acima. A seguinte tabela 12 mostra o tamanho das lipossomas (Z médio e índice de polidispersidade), o % de encapsulação de ácido nucleico em cada lipossoma, juntamente com a atividade de SEAP detectada nos dias 1 e 6 após a injeção. A atividade de SEAP é relativa às lipossomas “DlinDMA (02)” feitas de DlinDMA, colesterol e PEG-DMG.

Tabela 12. Liberação de lipossoma de réplicons de ácido nucleico

E nº.	Zav (pdl)	% de encapsulação	SEAP dia 1	SEAP dia 6
DlinDMA (01)	154,6 (0,131)	95,5	80,9	71,1
DlinDMA (02)	162,0 (0,134)	85,3	100	100
Comparativo (01)	133,9 (0,185)	96,5	57	45,7
Comparativo (02)	134,6 (0,082)	97,6	54,2	4,3
E0014 (01)	158,3 (0,212)	62,0	65,7	44,9
E0014 (02)	164,2 (0,145)	86	62,2	39,7
E0024 (01)	131,0 (0,145)	74,0	91	154,8
E0024 (02)	134,6 (0,117)	81,5	90,4	142,6
E0026 (01)	164,0 (0,162)	76,0	76,9	329,8
E0026 (02)	177,8 (0,117)	72,8	67,1	227,9
E0084 (01)	116,0 (0,180)	79,8	25,5	12,4
E0084 (02)	136,3 (0,164)	74,9	24,8	23,1
E0065 (01)	140,6 (0,184)	77	26,5	163,3
E0065 (02)	138,6 (0,122)	87	29,7	74,8
E0078 (01)	176,7 (0,185)	50	76,5	187
E0078 (02)	199,5 (0,191)	46,3	82,4	329,8
E0069 (01)	165,3 (0,169)	72,2	65,1	453,9
E0069 (02)	179,5 (0,157)	65	68,5	658,2
E0108 (01)	129,7 (0,184)	78,4	113,4	47,8
E0108 (02)	147,6 (0,131)	80,9	78,2	10,4
E0115 (01)	129,2 (0,186)	71	113,6	242,2
E0115 (02)	139 (0,198)	75,2	71,8	187,2
E0099 (01)	135,7 (0,161)	78,8	65	10
E0099 (02)	158,3 (0,287)	69,4	78,8	8,2

Aspectos Adicionais da Invenção

[000758] A invenção compreende uma composição compreendendo

pelo menos um lipídeo catiônico, pelo menos um lipídeo auxiliar e pelo menos um lipídeo furtivo para liberação de um agente biologicamente ativo, em que o agente biologicamente ativo é para a liberação para um tecido ou célula selecionado de:

(a) o fígado ou células do fígado, em que a composição tem um lipídeo catiônico com um pKa de cerca de 6,2 ou acima; e (b) um tumor ou célula de tumor, em que a composição tem um lipídeo catiônico com um pKa de cerca de 6,2 ou abaixo.

[000759] A invenção compreende uma composição compreendendo pelo menos um lipídeo catiônico, pelo menos um lipídeo auxiliar e pelo menos um lipídeo furtivo para liberação de um agente biologicamente ativo, em que o agente biologicamente ativo é para a liberação para um tecido ou célula selecionado de:

(a) o fígado ou células do fígado, em que a composição tem um lipídeo catiônico com um pKa de cerca de 5,1 a cerca de 7,4; e (b) um tumor ou célula de tumor, em que a composição tem um lipídeo catiônico com um pKa de cerca de 5,0 a cerca de 6,7.

[000760] A invenção compreende uma composição dos parágrafos [00706] ou [00707], em que a composição também compreende um lipídeo neutro opcional.

[000761] A invenção compreende a composição de qualquer um dos parágrafos [00706], [00707] ou [00708], em que o agente biologicamente ativo é em uma quantidade eficaz para tratamento terapêutico de uma doença ou distúrbio.

[000762] A invenção compreende a composição dos parágrafos [00709], em que o agente biologicamente ativo é para liberação para o fígado ou uma célula do fígado e o lipídeo catiônico 1 tem um pKa pelo menos de cerca de 5,1 a cerca de 7,4.

[000763] A invenção compreende a composição do parágrafo [00709], em que o agente biologicamente ativo é para liberação para

um tumor ou células de tumor e o composto do parágrafo 1 tem um pKa de cerca de 5,0 a cerca de 6,7.

[000764] A invenção compreende a composição do parágrafo [00711], em que o lipídeo catiônico tem um pKa de cerca de 5,2 a cerca de 6,3.

[000765] A invenção compreende a composição do parágrafo [00711], em que o lipídeo catiônico tem um pKa de cerca de 5,4 a cerca de 6,2.

[000766] A invenção compreende a composição do parágrafo [00711], em que o lipídeo catiônico tem um pKa de cerca de 5,8 a cerca de 6,1.

[000767] A invenção compreende a composição de qualquer um ou mais do parágrafo [00711] até o parágrafo [00714], em que a composição é otimizada por seleção de pelo menos um de um lipídeo furtivo, método de formulação, relação de N/P, tamanho de partícula, e relação molar do lipídeo catiônico, um lipídeo neutro opcional, lipídeo auxiliar, lipídeo furtivo e um lipídeo com base em resorcinol de alquila opcional.

[000768] A invenção compreende a composição do parágrafo [00709], em que o agente biologicamente ativo é para liberação para o fígado ou uma célula do fígado, a composição compreendendo uma formulação compreendendo pelo menos um lipídeo catiônico com um pKa de cerca de 5,1 a cerca de 7,4.

[000769] A invenção compreende a composição do parágrafo [00716], em que o lipídeo catiônico tem um pKa de cerca de 5,3 a cerca de 7,3.

[000770] A invenção compreende a composição do parágrafo [00716], em que o lipídeo catiônico tem um pKa de cerca de 5,9 a cerca de 7,0.

[000771] A invenção compreende a composição do parágrafo [00716], em que o lipídeo catiônico tem um pKa de cerca de 6,2 a

cerca de 6,8.

[000772] A invenção compreende a composição de qualquer um ou mais do parágrafo [00716] até o parágrafo [00719], em que a composição é otimizada por seleção de pelo menos um de um lipídeo furtivo, método de formulação, relação de N/P, tamanho de partícula, e relação molar do lipídeo catiônico, um lipídeo neutro opcional, lipídeo auxiliar, lipídeo furtivo e um lipídeo com base em resorcinol de alquila opcional.

[000773] A invenção compreende a composição do parágrafo [00715], em que o pKa do lipídeo catiônico é de cerca de 5,4 a cerca de 5,9 para liberação para tumores semelhantes a Hep3B.

[000774] A invenção compreende a composição do parágrafo [00715], em que o pKa do lipídeo catiônico é de cerca de 5,6 a cerca de 6,1 para liberação para tumores semelhantes a HepG2 e semelhantes a 786-0.

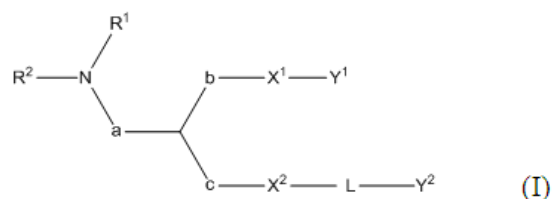
[000775] A invenção compreende um método para o tratamento de uma doença ou condição compreendendo a etapa de administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição de quaisquer dos parágrafos [00706] a [00722] a um paciente em necessidade do mesmo.

[000776] A invenção compreende o método do parágrafo [00723] em que a doença ou condição é um tumor, uma doença do fígado, ou uma doença que é responsiva ao tratamento com um constructo de RNAi.

[000777] A invenção compreende o método do parágrafo [00723] em que a doença ou condição é um tumor e o lipídeo catiônico em uma composição tem um pKa de cerca de 5,0 a cerca de 6,7.

[000778] A invenção compreende o método do parágrafo [00723] em que a doença ou condição é no fígado, e o lipídeo catiônico em uma composição tem um pKa de cerca de 5,1 a cerca de 7,4.

[000779] A invenção compreende um composto de Fórmula (I):



ou um sal ou derivado farmacêuticamente aceitável do mesmo,

em que:

R^1 e R^2 juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo C_{3-20} heterocicloalquila, C_{3-20} heterocicloalquenila, C_{3-20} heterocicloalquinila ou C_{5-20} heteroarila opcionalmente substituído;

a está ausente ou C_{1-4} alquilenos opcionalmente substituído;

b está ausente ou C_{1-4} alquilenos opcionalmente substituído;

c está ausente ou C_{1-4} alquilenos opcionalmente substituído;

X^1 é O ou S;

X^2 é O ou S;

Y^1 é C_{10-30} alquenila, C_{10-30} alquinila, C_{10-30} heteroalquenila ou C_{10-30} heteroalquinila opcionalmente substituído;

L está ausente ou $-(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f-$, em que

L^a é C_{1-15} alquilenos, C_{1-15} alquenilenos, C_{1-15} alquinilenos, C_{1-15} heteroalquilenos, C_{1-15} heteroalquenilenos ou C_{1-15} heteroalquinilenos opcionalmente substituído;

L^b é C_{6-14} arileno ou C_{5-13} heteroarileno opcionalmente substituído;

L^c é C_{1-15} alquilenos, C_{1-15} alquenilenos, C_{1-15} alquinilenos, C_{1-15} heteroalquilenos, C_{1-15} heteroalquenilenos ou C_{1-15} heteroalquinilenos opcionalmente substituído;

d é 0 ou 1;

e é 0 ou 1; e

f é 0 ou 1; e

Y^2 é um esteroide opcionalmente substituído.

[000780] A invenção compreende o composto do parágrafo [00727], em que **a** é selecionado de C₁₋₂ alquilenos opcionalmente substituído e C₁ alquilenos opcionalmente substituído.

[000781] A invenção compreende o composto dos parágrafos [00727] ou [00728], em que **b** é selecionado de C₀₋₂ alquilenos opcionalmente substituído e C₁ alquilenos opcionalmente substituído.

[000782] A invenção compreende o composto de qualquer um dos parágrafos [00728] a [00729], em que **c** está ausente ou é C₁ alquilenos opcionalmente substituído.

[000783] A invenção compreende o composto de qualquer um dos parágrafos [00727] a [00730], em que **a**, **b** e **c** são não substituídos.

[000784] A invenção compreende o composto de qualquer um dos parágrafos [00727] a [00731], em que R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo C₃₋₂₀ heterocicloalquila, C₃₋₂₀ heterocicloalquenila ou C₃₋₂₀ heterocicloalquinila opcionalmente substituído.

[000785] A invenção compreende o composto de qualquer um dos parágrafos [00727] a [00732], em que R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um composto selecionado de um grupo C₅₋₁₆ opcionalmente substituído cíclico e um grupo C₅₋₁₂ opcionalmente substituído cíclico.

[000786] A invenção compreende o composto do parágrafo [00733], em que R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo C₅, grupo C₆ ou grupo C₇ opcionalmente substituído cíclico.

[000787] A invenção compreende o composto de qualquer um dos parágrafos [00727] a [00734], em que R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados são selecionados de pelo menos um dos grupos cabeça H¹ a H⁵².

[000788] A invenção compreende o composto de qualquer um dos

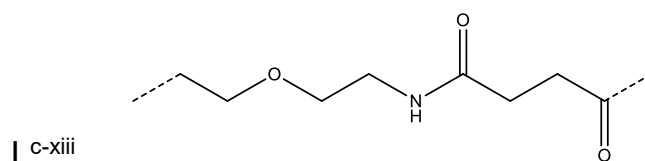
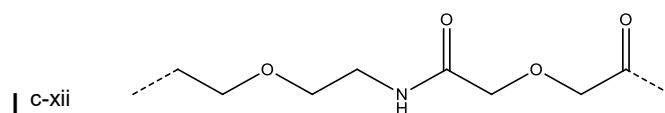
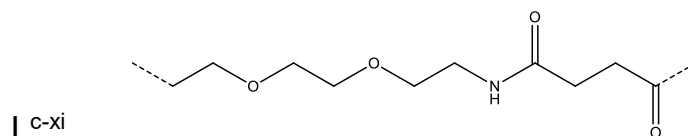
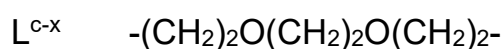
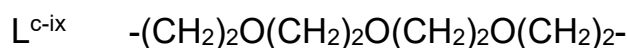
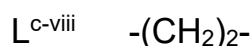
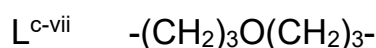
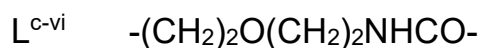
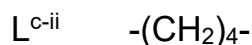
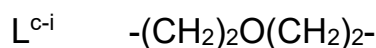
parágrafos [00727] a [00735], em que X^1 é O.

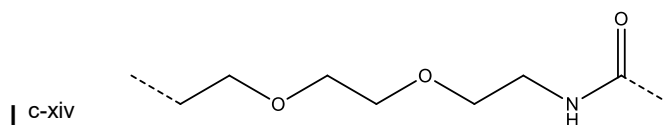
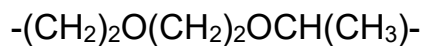
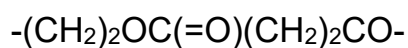
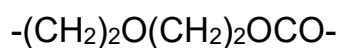
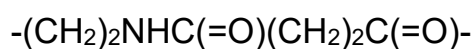
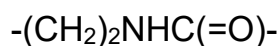
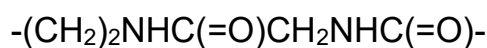
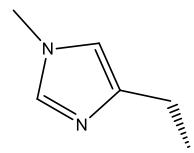
[000789] A invenção compreende o composto de qualquer um dos parágrafos [00727] a [00736], em que X^2 é O.

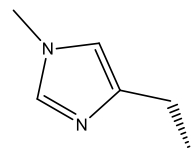
[000790] A invenção compreende o composto de qualquer um dos parágrafos [00727] a [00737] em que L compreende pelo menos um heteroátomo.

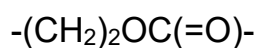
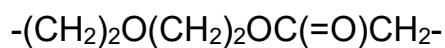
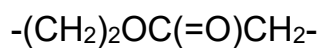
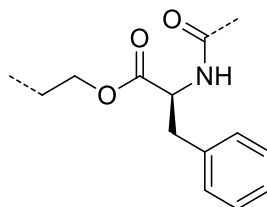
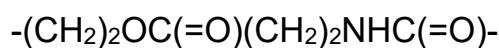
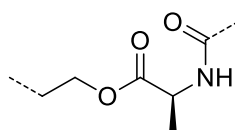
[000791] A invenção compreende o composto do parágrafo [00738], em que L compreende pelo menos um átomo O.

[000792] A invenção compreende o composto de qualquer um dos parágrafos [00727] a [00739], em que L^c é selecionado de uma das Fórmulas L^{c-i} a $L^{c-xxxxiii}$.

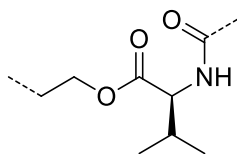


L^{c-xiv}L^{c-xv}L^{c-xvi}L^{c-xvii}L^{c-xviii}L^{c-xix}L^{c-xx}L^{c-xxi}L^{c-xxii}L^{c-xxiii}

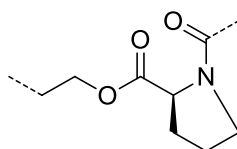
que a cadeia lateral 1 representa o grupo , a linha tracejada representando a ligação ao resto da molécula;

L^{c-xxiv}L^{c-xxv}L^{c-xxvi}L^{c-xxvii}L^{c-xxviii}L^{c-xxix}L^{c-xxx}

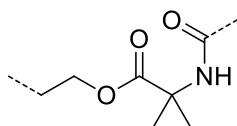
L c-xxxix



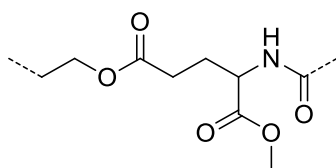
L c-xxxix



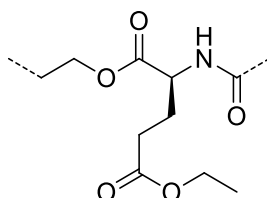
L c-xxxix



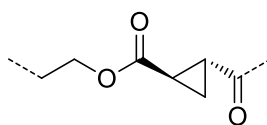
L c-xxxix

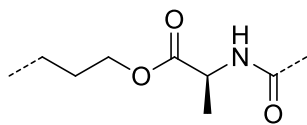


L c-xxxix

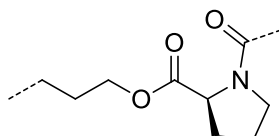
L c-xxxix $-(\text{CH}_2)_2\text{OCO}_2(\text{CH}_2)_2-$ L c-xxxix $-(\text{CH}_2)_2\text{OC}(=\text{O})\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{C}(=\text{O})-$ L c-xxxix $-(\text{CH}_2)_2\text{OC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_3\text{C}(=\text{O})-$ L c-xxxix $-(\text{CH}_2)_3\text{OC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_2\text{C}(=\text{O})-$

L c-xxxix





L C-xxxxxi

L C-xxxxxii $-(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{C}(=\text{O})-$ 

L C-xxxxxiii

[000793] A invenção compreende o composto de qualquer um dos parágrafos [00727] a [00740], em que **d** é 0; **e** é 0, e **f** é 1.

[000794] A invenção compreende o composto de qualquer um dos parágrafos [00727] a [00741], em que Y^1 é um grupo C_{12-28} .

[000795] A invenção compreende o composto de qualquer um dos parágrafos [00727] a [00742][000794], em que Y^1 tem pelo menos um grupo alqueno.

[000796] A invenção compreende o composto do parágrafo [00743], em que Y^1 tem pelo menos um grupo alqueno cis insaturado.

[000797] A invenção compreende o composto de qualquer um dos parágrafos [00727] a [00741], em que Y^1 é selecionado de Y^{1-i} a Y^{1-vii} .

[000798] A invenção compreende o composto de qualquer um dos parágrafos [00727] a [00745], em que Y^2 é ligado a L por meio de um átomo de oxigênio no esteroide opcionalmente substituído.

[000799] A invenção compreende o composto do parágrafo [00746], em que Y^2 é um esterol em que o átomo de hidrogênio do grupo hidróxi na posição 3 do anel esteroide A foi removido.

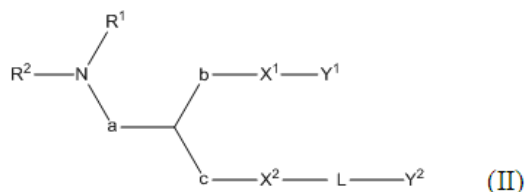
[000800] A invenção compreende o composto do parágrafo [00746], em que o esterol é selecionado do grupo que consiste em: anasterol; avenasterol; beta-sitosterol; brassicasterol; calciferol; campesterol; calinosterol; quinasterol; colestanol; colesterol; coprostanol; cicloartenol; desidrocolesterol; desmosterol; di-hidrocalciferol; di-

hidrocolesterol; di-hidroergosterol; dinosterol; epicolesterol; ergosterol; fucosterol; hexa-hidrolumisterol; hexaol; hidroxicolesterol; lanosterol; lumisterol; parqueol; poriferasterol; saringosterol; sitostanol; sitosterol; estigmastanol; estigmasterol; weinbersterol; zimosterol; ácidos biliares de esterol (incluindo um ou mais selecionados de ácido cólico; ácido quenodeoxicólico; ácido glicocólico; ácido taurocólico; ácido desoxicólico, e ácido litocólico); e/ou

um sal ou um derivado farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[000801] A invenção compreende o composto do parágrafo [00748], em que o esterol é colesterol.

[000802] A invenção compreende o composto do parágrafo [00727] compreendendo a Fórmula (II):



ou um sal ou derivado farmaceuticamente aceitável do mesmo,

em que:

R^1 e R^2 juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo C_{3-20} heterocicloalquila, C_{3-20} heterocicloalquenila, C_{3-20} heterocicloalquinila ou C_{5-20} heteroarila opcionalmente substituído;

a está ausente ou C_{1-4} alquilenos opcionalmente substituído;

b está ausente ou C_{1-4} alquilenos opcionalmente substituído;

c está ausente ou C_{1-4} alquilenos opcionalmente substituído;

X^1 é O ou S;

X^2 é O ou S;

Y^1 é C_{10-30} alquenila, C_{10-30} alquinila, C_{10-30} heteroalquenila ou C_{10-30} heteroalquinila opcionalmente substituído;

L é $-(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f$, em que

L^a é C_{1-15} alquilenos, C_{1-15} alquenilenos, C_{1-15} alquinilenos, C_{1-15} heteroalquilenos, C_{1-15} heteroalquenilenos ou C_{1-15} heteroalquinilenos opcionalmente substituído;

L^b é C_{6-14} arileno ou C_{5-13} heteroarileno opcionalmente substituído;

L^c é C_{1-15} alquilenos, C_{1-15} alquenilenos, C_{1-15} alquinilenos, C_{1-15} heteroalquilenos, C_{1-15} heteroalquenilenos ou C_{1-15} heteroalquinilenos opcionalmente substituído;

d é 0 ou 1;

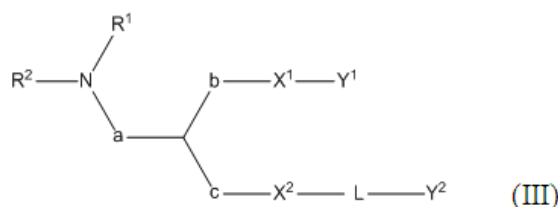
e é 0 ou 1; e

f é 0 ou 1;

contanto que L compreenda um ou mais heteroátomos, e

Y^2 é um esteroide opcionalmente substituído.

[000803] A invenção compreende o composto do parágrafo [00727] compreendendo a Fórmula (III):



ou um sal ou derivado farmacêuticamente aceitável do mesmo,

em que:

R^1 e R^2 juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo C_{3-20} heterocicloalquila, C_{3-20} heterocicloalquenila, C_{3-20} heterocicloalquinila ou C_{5-20} heteroarila opcionalmente substituído;

a é metileno;

b é metileno;

c está ausente;

X^1 é O ou S;

X^2 é O ou S;

Y^1 é C_{10-30} alquenila, C_{10-30} alquinila, C_{10-30} heteroalquenila ou C_{10-30} heteroalquinila opcionalmente substituído;

L é $-(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f-$, em que

L^a é C_{1-15} alquileno, C_{1-15} alquenileno, C_{1-15} alquinileno, C_{1-15} heteroalquileno, C_{1-15} heteroalquenileno ou C_{1-15} heteroalquinileno opcionalmente substituído;

L^b é C_{6-14} arileno ou C_{5-13} heteroarileno opcionalmente substituído;

L^c é C_{1-15} alquileno, C_{1-15} alquenileno, C_{1-15} alquinileno, C_{1-15} heteroalquileno, C_{1-15} heteroalquenileno ou C_{1-15} heteroalquinileno opcionalmente substituído;

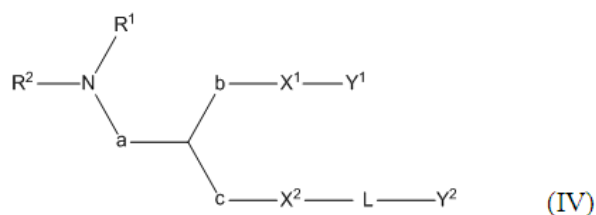
d é 0 ou 1;

e é 0 ou 1; e

f é 0 ou 1; e

Y^2 é um esteroide opcionalmente substituído.

[000804] A invenção compreende o composto do parágrafo [00727] compreendendo a Fórmula (IV):



ou um sal ou derivado farmacêuticamente aceitável do mesmo,

em que:

R^1 e R^2 juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo C_{3-20} heterocicloalquila, C_{3-20} heterocicloalquenila, C_{3-20} heterocicloalquinila ou C_{5-20} heteroarila opcionalmente substituído;

a é metileno;

b é metileno;

c está ausente;

X¹ é O ou S;

X² é O ou S;

Y¹ é C₁₀₋₃₀ alquenila, C₁₀₋₃₀ alquinila, C₁₀₋₃₀ heteroalquenila ou C₁₀₋₃₀ heteroalquinila opcionalmente substituído;

L é -(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f, em que

L^a é C₁₋₁₅ alquilenos, C₁₋₁₅ alquenilenos, C₁₋₁₅ alquinilenos, C₁₋₁₅ heteroalquilenos, C₁₋₁₅ heteroalquenilenos ou C₁₋₁₅ heteroalquinilenos opcionalmente substituídos;

L^b é C₆₋₁₄ arileno ou C₅₋₁₃ heteroarileno opcionalmente substituído;

L^c é C₁₋₁₅ alquilenos, C₁₋₁₅ alquenilenos, C₁₋₁₅ alquinilenos, C₁₋₁₅ heteroalquilenos, C₁₋₁₅ heteroalquenilenos ou C₁₋₁₅ heteroalquinilenos opcionalmente substituídos;

d é 0 ou 1;

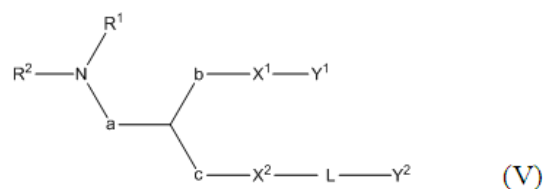
e é 0 ou 1; e

f é 0 ou 1;

contanto que L compreenda um ou mais heteroátomos, e

Y² é um esteroide opcionalmente substituído.

[000805] A invenção compreende o composto do parágrafo [00727] compreendendo a Fórmula (V):



ou um sal ou derivado farmacêuticamente aceitável do mesmo,

em que:

R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo C₃₋₂₀ heterocicloalquila, C₃₋₂₀ heterociclo-

alquenila, C₃₋₂₀ heterocicloalquinila ou C₅₋₂₀ heteroarila opcionalmente substituído;

a é metileno;

b é metileno;

c está ausente;

X¹ é O;

X² é O;

Y¹ é C₁₀₋₃₀ alquenila, C₁₀₋₃₀ alquinila, C₁₀₋₃₀ heteroalquenila ou C₁₀₋₃₀ heteroalquinila opcionalmente substituído;

L é $-(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f$, em que

L^a é C₁₋₁₅ alquilenos, C₁₋₁₅ alquenilenos, C₁₋₁₅ alquinilenos, C₁₋₁₅ heteroalquilenos, C₁₋₁₅ heteroalquenilenos ou C₁₋₁₅ heteroalquinilenos opcionalmente substituídos;

L^b é C₆₋₁₄ arileno ou C₅₋₁₃ heteroarileno opcionalmente substituído;

L^c é C₁₋₁₅ alquilenos, C₁₋₁₅ alquenilenos, C₁₋₁₅ alquinilenos, C₁₋₁₅ heteroalquilenos, C₁₋₁₅ heteroalquenilenos ou C₁₋₁₅ heteroalquinilenos opcionalmente substituídos;

d é 0 ou 1;

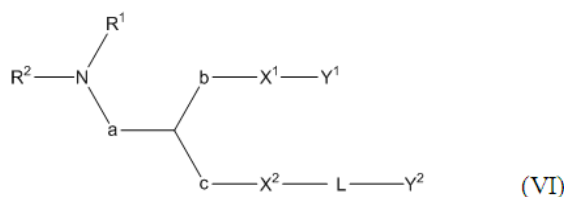
e é 0 ou 1; e

f é 0 ou 1;

contanto que L compreenda um ou mais heteroátomos, e

Y² é um esteroide opcionalmente substituído.

[000806] A invenção compreende o composto do parágrafo [00727] compreendendo a Fórmula (VI):



ou um sal ou derivado farmacêuticamente aceitável do mesmo,

em que:

R^1 e R^2 juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo C_{3-20} heterocicloalquila, C_{3-20} heterocicloalquenila, C_{3-20} heterocicloalquinila ou C_{5-20} heteroarila opcionalmente substituído;

a é metileno;

b é metileno;

c está ausente;

X^1 é O;

X^2 é O;

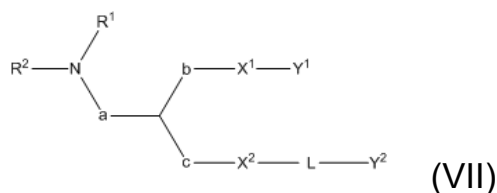
Y^1 é C_{10-30} alquenila, C_{10-30} alquinila, C_{10-30} heteroalquenila ou C_{10-30} heteroalquinila opcionalmente substituído;

L é $-L^c-$, em que

L^c é C_{1-15} heteroalquilenos, C_{1-15} heteroalquenilenos ou C_{1-15} heteroalquinilenos opcionalmente substituído; e

Y^2 é um esteroide opcionalmente substituído.

[000807] A invenção compreende o composto do parágrafo [00727] compreendendo a Fórmula (VII):



ou um sal ou derivado farmacêuticamente aceitável do mesmo,

em que:

R^1 e R^2 juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo C_{3-20} heterocicloalquila, C_{3-20} heterocicloalquenila, C_{3-20} heterocicloalquinila ou C_{5-20} heteroarila opcionalmente substituído;

a é metileno;

b é metileno;

c está ausente;

X¹ é O;

X² é O;

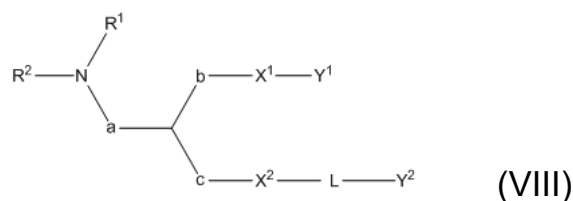
Y¹ é um grupo C₁₆₋₂₂ alquenila opcionalmente substituído;

L é -L^c-, em que

L^c é C₁₋₁₅ heteroalquilenos, C₁₋₁₅ heteroalquenileno ou C₁₋₁₅ heteroalquinileno opcionalmente substituído; e

Y² é um esteroide opcionalmente substituído.

[000808] A invenção compreende o composto do parágrafo [00727] compreendendo a Fórmula (VIII):



ou um sal ou derivado farmacêuticamente aceitável do mesmo,

em que:

R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo C₃₋₂₀ heterocicloalquila, C₃₋₂₀ heterocicloalquenila, C₃₋₂₀ heterocicloalquinila ou C₅₋₂₀ heteroarila opcionalmente substituído;

a é metileno;

b é metileno;

c está ausente;

X¹ é O;

X² é O;

Y¹ é um grupo C₁₆₋₂₂ alquenila opcionalmente substituído;

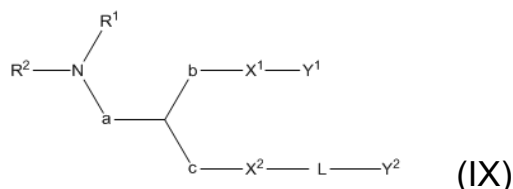
L é -L^c-, em que

L^c é C₁₋₁₅ heteroalquilenos, C₁₋₁₅ heteroalquenileno ou C₁₋₁₅ heteroalquinileno opcionalmente substituído; e

Y² é colesterol conectado através do grupo hidróxi na

posição 3 do anel esteroide A, o átomo de hidrogênio do referido grupo hidróxi estando ausente.

[000809] A invenção compreende o composto do parágrafo [00727] compreendendo a Fórmula (IX):



ou um sal ou derivado farmacêuticamente aceitável do mesmo,

em que:

R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo C₃₋₂₀ heterocicloalquila, C₃₋₂₀ heterocicloalquenila, C₃₋₂₀ heterocicloalquinila ou C₅₋₂₀ heteroarila opcionalmente substituído;

a é metileno;

b é metileno;

c está ausente;

X¹ é O ou S;

X² é O ou S;

Y¹ é C₁₀₋₃₀ alquenila, C₁₀₋₃₀ alquinila, C₁₀₋₃₀ heteroalquenila ou C₁₀₋₃₀ heteroalquinila opcionalmente substituído;

L é -(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f, em que

L^a é C₁₋₁₅ alquileno, C₁₋₁₅ alquenileno, C₁₋₁₅ alquinileno, C₁₋₁₅ heteroalquileno, C₁₋₁₅ heteroalquenileno ou C₁₋₁₅ heteroalquinileno opcionalmente substituído;

L^b é C₆₋₁₄ arileno ou C₅₋₁₃ heteroarileno opcionalmente substituído;

L^c é C₁₋₁₅ alquileno, C₁₋₁₅ alquenileno, C₁₋₁₅ alquinileno, C₁₋₁₅ heteroalquileno, C₁₋₁₅ heteroalquenileno ou C₁₋₁₅ heteroalquinileno opcionalmente substituído;

d é 0 ou 1;

e é 0 ou 1; e

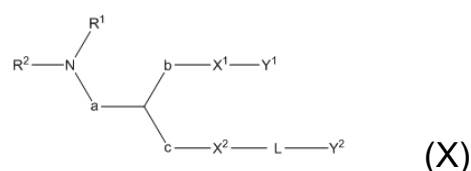
f é 0 ou 1;

contanto que L compreenda um ou mais heteroátomos, e

Y² é um esteroide opcionalmente substituído; e

em que o pKa do composto é de cerca de 5,1 a cerca de 7,4.

[000810] A invenção compreende o composto do parágrafo [00727] compreendendo a Fórmula (X):



ou um sal ou derivado farmacêuticamente aceitável do mesmo,

em que:

R¹ e R² juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual eles são ligados formam um grupo C₃₋₂₀ heterocicloalquila, C₃₋₂₀ heterocicloalquenila, C₃₋₂₀ heterocicloalquinila ou C₅₋₂₀ heteroarila opcionalmente substituído;

a é metileno;

b é metileno;

c está ausente;

X¹ é O ou S;

X² é O ou S;

Y¹ é C₁₀₋₃₀ alquenila, C₁₀₋₃₀ alquinila, C₁₀₋₃₀ heteroalquenila ou C₁₀₋₃₀ heteroalquinila opcionalmente substituído;

L é -(L^a)_d-(L^b)_e-(L^c)_f, em que

L^a é C₁₋₁₅ alquileno, C₁₋₁₅ alquenileno, C₁₋₁₅ alquinileno, C₁₋₁₅ heteroalquileno, C₁₋₁₅ heteroalquenileno ou C₁₋₁₅ heteroalquinileno opcionalmente substituído;

L^b é C_{6-14} arileno ou C_{5-13} heteroarileno opcionalmente substituído;

L^c é C_{1-15} alquilenos, C_{1-15} alquenilenos, C_{1-15} alquinilenos, C_{1-15} heteroalquilenos, C_{1-15} heteroalquenilenos ou C_{1-15} heteroalquinilenos opcionalmente substituído;

d é 0 ou 1;

e é 0 ou 1; e

f é 0 ou 1;

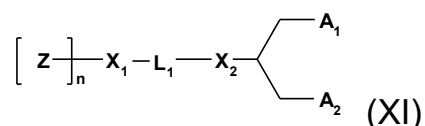
contanto que L compreenda um ou mais heteroátomos, e

Y^2 é um esteroide opcionalmente substituído; e

em que o pK_a do composto é de cerca de 5,0 a cerca de 6,7.

[000811] A invenção compreende um composto de qualquer uma das Fórmulas I a X nos parágrafos [000779] até [000810], em que o composto é selecionado de qualquer um ou mais de E0001-E0171 e E0175-E0180.

[000812] A invenção compreende um lipídeo furtivo de Fórmula (XI)



ou um sal ou derivado farmacêuticamente aceitável do mesmo,

em que

Z é um componente de grupo cabeça hidrofílico selecionado de PEG e polímeros com base em poli(oxazolina), poli(etileno óxido), poli(álcool vinílico), poli(glicerol), poli(N-vinilpirrolidona), poli[N-(2-hidroxipropil)metacrilamida] e poli(aminoácido)s, em que o polímero pode ser linear ou ramificado, e em que o polímero pode ser opcionalmente substituído;

em que Z é polimerizado por n subunidades;

n é um grau de número médio de polimerização entre 10 e

200 unidades de Z, em que n é otimizado para diferentes tipos de polímero;

L_1 é um ligante C_{1-10} alquilenos ou C_{1-10} heteroalquilenos opcionalmente substituído incluindo zero, um, dois ou mais de um éter (por exemplo, -O-), éster (por exemplo, -C(O)O-), succinato (por exemplo, -O(O)C-CH₂-CH₂-C(O)O-), carbamato (por exemplo, -OC(O)-NR'-), carbonato (por exemplo, -OC(O)O-), cetona (por exemplo, -C-C(O)-C-), carbonila (por exemplo, -C(O)-), ureia (por exemplo, -NRC(O)NR'-), amina (por exemplo, -NR'-), amida (por exemplo, -C(O)NR'-), imina (por exemplo, -C(NR')-), tioéter (por exemplo, -S-), xantato (por exemplo, -OC(S)S-), e fosfodiéster (por exemplo, -OP(O)₂O-); qualquer um dos quais pode ser substituído por zero, um ou mais grupos Z;

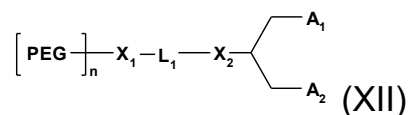
em que R' é independentemente selecionado de H, -NH-, -O-, -S-, um fosfato ou um C_{1-10} alquilenos opcionalmente substituído;

X_1 e X_2 são independentemente selecionados de um carbono ou um heteroátomo selecionado de -NH-, -O-, -S- ou um fosfato;

A_1 e A_2 são independentemente selecionados de uma C_{6-30} alquila, C_{6-30} alquenila, e C_{6-30} alquinila, em que A_1 e A_2 podem ser iguais ou diferentes,

ou em que A_1 e A_2 juntamente com o átomo de carbono ao qual eles são ligados formam um esteroide opcionalmente substituído.

[000813] A invenção compreende o lipídeo furtivo do parágrafo [00760] compreendendo a Fórmula (XII)



ou um sal ou derivado farmacêuticamente aceitável do mesmo,

em que

PEG é uma subunidade de poli(etileno glicol), em que o

PEG pode ser linear ou ramificado;

n é um grau de número médio de polimerização entre 10 e 200 unidades de PEG, preferivelmente cerca de 23 unidades, cerca de 45 unidades ou cerca de 68 unidades;

L₁ é um ligante C₁₋₁₀ heteroalquilenos opcionalmente substituído contendo um, dois ou mais de um éter, éster, succinato, carbamato, carbonato, cetona, carbonila, ureia, amina, amida, imina, tioéter, xantato, e fosfodiéster; qualquer um dos quais pode ser substituído por zero, um ou mais grupos PEG;

X₁ e X₂ são independentemente selecionados de carbono ou oxigênio;

A₁ e A₂ são independentemente selecionados de uma C₆₋₃₀ alquila, C₆₋₃₀ alquenila, e C₆₋₃₀ alquinila, em que A₁ e A₂ podem ser iguais ou diferentes,

ou em que A₁ e A₂ juntamente com o átomo de carbono ao qual eles são ligados formam um esteroide opcionalmente substituído.

[000814] A invenção compreende um composto de qualquer um dos parágrafos [00760 e [00761]], em que o composto é selecionado de qualquer um ou mais de S001 até S009 e S012 até S026.

[000815] A invenção compreende o composto de qualquer um dos parágrafos [00727] a [00759], em que o pKa do composto é de cerca de 5,1 a cerca de 7,4, para uso em uma formulação para liberação de um agente biologicamente ativo para o fígado ou uma célula do fígado.

[000816] A invenção compreende o composto de qualquer um dos parágrafos [00727] a [00759], em que o pKa do composto é de cerca de 6,2 ou acima, para uso em uma formulação para liberação de um agente biologicamente ativo para o fígado ou uma célula do fígado.

[000817] A invenção compreende o composto do parágrafo [00764], em que o pKa do composto é de cerca de 5,9 a cerca de 7,0, para uso em uma formulação para liberação de um agente biologicamente ativo

para o fígado ou uma célula do fígado.

[000818] A invenção compreende o composto de qualquer um dos parágrafos [00727] a [00759], em que o pKa do composto é de cerca de 5,0 a cerca de 6,7, para uso em uma formulação para liberação de um agente biologicamente ativo para um tumor ou uma célula de tumor.

[000819] A invenção compreende o composto de qualquer um dos parágrafos [00727] a [00759], em que o pKa do composto é de cerca de 5,4 a cerca de 6,2, para uso em uma formulação para liberação de um agente biologicamente ativo para um tumor ou uma célula de tumor.

[000820] A invenção compreende o composto de qualquer um dos parágrafos [000779] a [000811], em que o pKa do composto é de cerca de 6,2 ou abaixo, para uso em uma formulação para liberação de um agente biologicamente ativo para um tumor ou uma célula de tumor.

[000821] A invenção compreende o composto de quaisquer dos parágrafos [00727] a [00768] para uso em uma formulação para liberação de um agente biologicamente ativo para terapia.

[000822] A invenção compreende uma composição compreendendo um ou mais compostos de qualquer um dos parágrafos [00727] a [00769] para uso em uma formulação para liberação de um agente biologicamente ativo para terapia.

[000823] A invenção compreende a composição do parágrafo [00770] também compreendendo pelo menos um componente de lipídeo adicional além do composto de qualquer um dos parágrafos [00727] a [00769].

[000824] A invenção compreende a composição de qualquer um dos parágrafos [00706] a [00722] e parágrafo [00771] compreendendo uma formulação de lipídeo compreendendo um ou mais componentes de lipídeo, em que o componente de lipídeo é selecionado do grupo que

consiste em um ou mais de um lipídeo catiônico, um lipídeo neutro opcional, um lipídeo auxiliar, um lipídeo furtivo e um lipídeo com base em resorcinol de alquila opcional.

[000825] A invenção compreende a composição do parágrafo [00772], em que o lipídeo furtivo é selecionado de um lipídeo furtivo de Fórmula XI ou Fórmula XII.

[000826] A invenção compreende a composição do parágrafo [00772], em que a composição é otimizada para pelo menos um parâmetro incluindo, porém não limitado à seleção individual do pKa do lipídeo catiônico otimizado para o tipo de célula ou órgão que está sendo alvejado, o lipídeo catiônico usado, o lipídeo furtivo usado, o lipídeo auxiliar, o lipídeo neutro usado, se o lipídeo neutro estiver presente ou ausente, a relação do lipídeo auxiliar, lipídeo neutro opcional, lipídeo furtivo e lipídeo catiônico selecionados, a relação de N/P, o tamanho de partícula, o regime de dosagem, a dose administrada, o método de formulação, e similares.

[000827] A invenção compreende a composição de qualquer um dos parágrafos [00706] a [00722] e parágrafos [00770] a [00774], também compreendendo um agente biologicamente ativo.

[000828] A invenção compreende a composição do parágrafo [00775] em que o referido agente biologicamente ativo é selecionado do grupo que consiste em anticorpos, colesterol, hormônios, antivirais, peptídeos, polipeptídeos, proteínas, nucleoproteínas, quimioterápicos, fármacos de baixo peso molecular, vitaminas, cofatores, nucleosídeos, derivados de nucleosídeo, nucleotídeos, oligonucleotídeos, ácidos nucleicos enzimáticos, ácidos nucleicos anti-senso, oligonucleotídeos de formação triplex, quimeras anti-senso 2,5-A, alozimas, aptâmeros, moléculas de RNA iscas e análogos dos mesmos, e moléculas de ácido nucleico pequenas, tais como um agente de interferência de RNA (RNAi), ácido nucleico de interferência curto (siNA), RNA de

interferência curto (siRNA), RNA de filamento duplo (dsRNA), micro-RNA (miRNA), e RNA grampo de cabelo curto (shRNA).

[000829] A invenção compreende a composição do parágrafo [00776] em que o referido agente biologicamente ativo é um nucleosídeo ou derivado de nucleosídeo.

[000830] A invenção compreende a composição do parágrafo [00777] em que o referido agente biologicamente ativo é selecionado de um RNAi, um siNA, um inibidor de RNAi, um miRNA, um siRNA e um shRNA.

[000831] A invenção compreende a composição do parágrafo [00772], em que o lipídeo catiônico é selecionado de um ou mais dos lipídeos catiônicos de E0007, E0008, E0011, E0014, E0015, E0016, E0017, E0018, E0019, E0022, E0024, E0025, E0026, E0032, E0034, E0040, E0042, E0043, E0045, E0048, E0049, E0051, E0052, E0053, E0054, E0055 e E0118.

[000832] A invenção compreende a composição do parágrafo [000824], em que o lipídeo catiônico é selecionado dos lipídeos catiônicos de E0008, E0011, E0025, E0026, E0075, E0076, E0077, E0085, E0088, E0095, E0104, E0178 e E0179.

[000833] A invenção compreende a composição do parágrafo [00772], a composição compreendendo pelo menos um lipídeo catiônico selecionado de E0008, E0011, E0025, E0026, E0075, E0076, E0077, E0085, E0088, E0095, E0104, E0178 e E0179.

[000834] A invenção compreende a composição do parágrafo [00772], a composição compreendendo pelo menos um lipídeo catiônico selecionado de E0011, E0025, E0026, E0075, E0076, E0077 e E0088.

[000835] A invenção compreende a composição do parágrafo [00772], em que o lipídeo furtivo é selecionado dos lipídeos furtivos de S001, S002, S003, S004, S005, S006, S007, S008, S009, S010, S011,

S012, S013, S014, S015, S016, S017, S018, S019, S020, S021, S022, S023, S024, S025 e S026.

[000836] A invenção compreende qualquer um ou mais dos compostos, formulações e/ou composições acima, que também compreendem um veículo farmaceuticamente aceitável.

[000837] A invenção compreende um *kit* compreendendo qualquer um ou mais dos compostos, formulações e composições acima, e e instruções para uso.

[000838] A invenção compreende um método para o tratamento de uma doença ou condição em um paciente em necessidade do mesmo, o método compreendendo a etapa de administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente biologicamente ativo em uma formulação compreendendo uma ou mais composições de quaisquer dos parágrafos [00706] a [00722] e parágrafos [000822] a [000835].

[000839] A invenção compreende um método para liberação de um agente biologicamente ativo para uma célula ou tecido, cujo método compreende administrar a composição de qualquer um dos parágrafos [00706] a [00722] e parágrafos [000822] a [000835] à célula ou tecido.

[000840] A invenção compreende o método do parágrafo [00787] em que a doença ou condição é um tumor, uma doença do fígado, ou uma doença que é responsiva ao tratamento com um constructo de RNAi.

[000841] A invenção compreende o método do parágrafo [00787] em que a doença ou condição é um tumor e o lipídeo catiônico em uma composição tem um pKa de cerca de 5,0 a cerca de 6,7.

[000842] A invenção compreende o método do parágrafo [00787] em que a doença ou condição é um tumor e o lipídeo catiônico em uma composição tem um pKa de cerca de 6,2 ou abaixo.

[000843] A invenção compreende o método do parágrafo [00787] em que a doença ou condição é um tumor e o lipídeo catiônico em uma

composição tem um pKa de cerca de 5,0 a cerca de 6,7.

[000844] A invenção compreende o método do parágrafo [00787] em que a doença ou condição é no fígado, e o lipídeo catiônico em uma composição tem um pKa de cerca de 5,1 a cerca de 7,4.

[000845] A invenção compreende o método dos parágrafos [00786] a [00792] em que o referido agente biologicamente ativo é selecionado do grupo que consiste em anticorpos, colesterol, hormônios, antivirais, peptídeos, polipeptídeos, proteínas, nucleoproteínas, quimioterápicos, fármacos de baixo peso molecular, vitaminas, cofatores, nucleosídeos, derivados de nucleosídeo, nucleotídeos, oligonucleotídeos, ácidos nucleicos enzimáticos, ácidos nucleicos anti-senso, oligonucleotídeos de formação triplex, quimeras anti-senso 2,5-A, alozimas, aptâmeros, moléculas de RNA iscas e análogos dos mesmos, e moléculas de ácido nucleico pequenas, tais como um agente de interferência de RNA (RNAi), ácido nucleico de interferência curto (siNA), RNA de interferência curto (siRNA), RNA de filamento duplo (dsRNA), micro-RNA (miRNA), e RNA grampo de cabelo curto (shRNA).

[000846] A invenção compreende o método do parágrafo [00793] em que o referido agente biologicamente ativo é um nucleosídeo ou derivado de nucleosídeo.

[000847] A invenção compreende o método do parágrafo [00794] em que o referido agente biologicamente ativo é selecionado de um RNAi, um siNA, um inibidor de RNAi, um miRNA, um siRNA e um shRNA.

[000848] A menos que de outro modo definido, os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado como aquele habitualmente entendido por um especialista familiar com o campo ao qual a invenção pertence.

[000849] A menos que de outro modo indicado, é assumido que todos os outros métodos, etapas, técnicas e manipulações que não

são especificamente descritos em detalhes podem ser realizados e foram realizados de uma maneira conhecida pela pessoa versada. Referência é, por exemplo, feita aos manuais padrões e à técnica antecedente geral e às outras referências citadas aqui.

[000850] Reivindicações à invenção são não limitantes e são fornecidas abaixo.

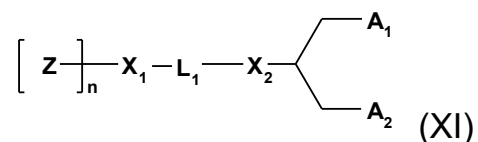
[000851] Embora modalidades particulares e reivindicações tenham sido descritas aqui em detalhes, isto foi feito por meio de exemplo para propósitos de ilustração apenas, e não é pretendido ser limitante com respeito ao escopo das reivindicações anexas, ou ao escopo da matéria objeto de reivindicações de qualquer pedido futuro correspondente. Em particular, é contemplado pelos inventores que várias substituições, alterações, e modificações podem ser feitas à invenção sem se afastar do espírito e escopo da invenção como definido pelas reivindicações. A escolha de material de partida, material biológico de interesse, ou método de montagem de lipossoma é acreditada ser uma matéria de via para uma pessoa versada na técnica com conhecimento das modalidades descritas aqui. Outros aspectos, vantagens, e modificações são considerados incluir-se no escopo das seguintes reivindicações. O replanejamento do escopo da reivindicação nos últimos pedidos correspondentes depositados pode ser devido às limitações pelas leis de patente de vários países e não deve ser interpretado como abandonando a matéria objeto das reivindicações.

Tabela de Sequências

SEQ ID NO:	Sequência (5' a 3')	Tipo
1	UUu AAU UGA AAC cAA GAc Auu	Artificial
2	uGu cuu GGu uuc AAu uAA Auu	Artificial
3	UAU UUA AgG AGG GUG AuC Uuu	Artificial
4	AGA Uca cCC Ucc uuA AAU auu	Artificial

REIVINDICAÇÕES

1. Lipídeo furtivo, caracterizado pelo fato de que apresenta a Fórmula (XI)



ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, na qual

Z é um componente de grupo cabeça hidrofílico selecionado de PEG e polímeros com base em poli(oxazolina), poli(etileno óxido), poli(vinílico álcool), poli(glicerol), poli(N-vinilpirrolidona), poli[N-(2-hidroxipropil)metacrilamida] e poli(aminoácido)s, em que o polímero pode ser linear ou ramificado, e em que o polímero pode ser opcionalmente substituído;

sendo que Z é polimerizado por n subunidades;

n é um grau de número médio de polimerização entre 10 e 200 unidades de Z, em que n é otimizado para diferentes tipos de polímero;

L₁ é um ligante de C₁₋₁₀ heteroalquileno opcionalmente substituído, incluindo zero, um, dois ou mais de um éster (por exemplo, -C(O)O-), succinato (por exemplo, -O(O)C-CH₂-CH₂-C(O)O-), carbamato (por exemplo, -OC(O)-NR'-), carbonato (por exemplo, -OC(O)O-), cetona (por exemplo, -C-C(O)-C-), carbonila (por exemplo, -C(O)-), ureia (por exemplo, -NRC(O)NR'-), amina (por exemplo, -NR'-), amida (por exemplo, -C(O)NR'-), imina (por exemplo, -C(NR')-), tioéter (por exemplo, -S-), xantato (por exemplo, -OC(S)S-), e fosfodiéster (por exemplo, -OP(O)₂O-); qualquer dos quais pode ser substituído por zero, um ou mais grupos Z;

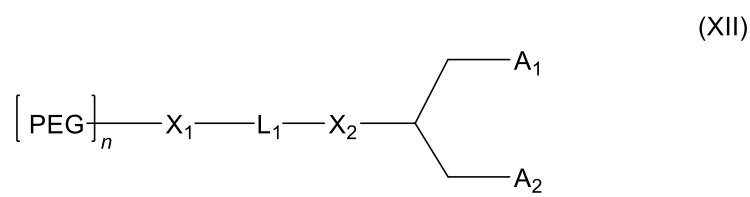
R' é independentemente selecionado de H, -NH-, -NH₂-, -O-, -S-, um fosfato ou um C₁₋₁₀ alquileno opcionalmente substituído;

X₁ e X₂ são independentemente selecionados de um

carbono ou um heteroátomo selecionado de -NH-, -O-, -S- ou um fosfato;

A_1 e A_2 são independentemente selecionados de uma C_{6-30} alquila, C_{6-30} alquenila, e C_{6-30} alquinila, sendo que A_1 e A_2 podem ser iguais ou diferentes.

2. Lípideo furtivo, de acordo com a reivindicação 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de que apresenta a Fórmula (XII):



na qual

PEG é uma subunidade de poli(etilenoglicol), na qual o PEG pode ser linear ou ramificado;

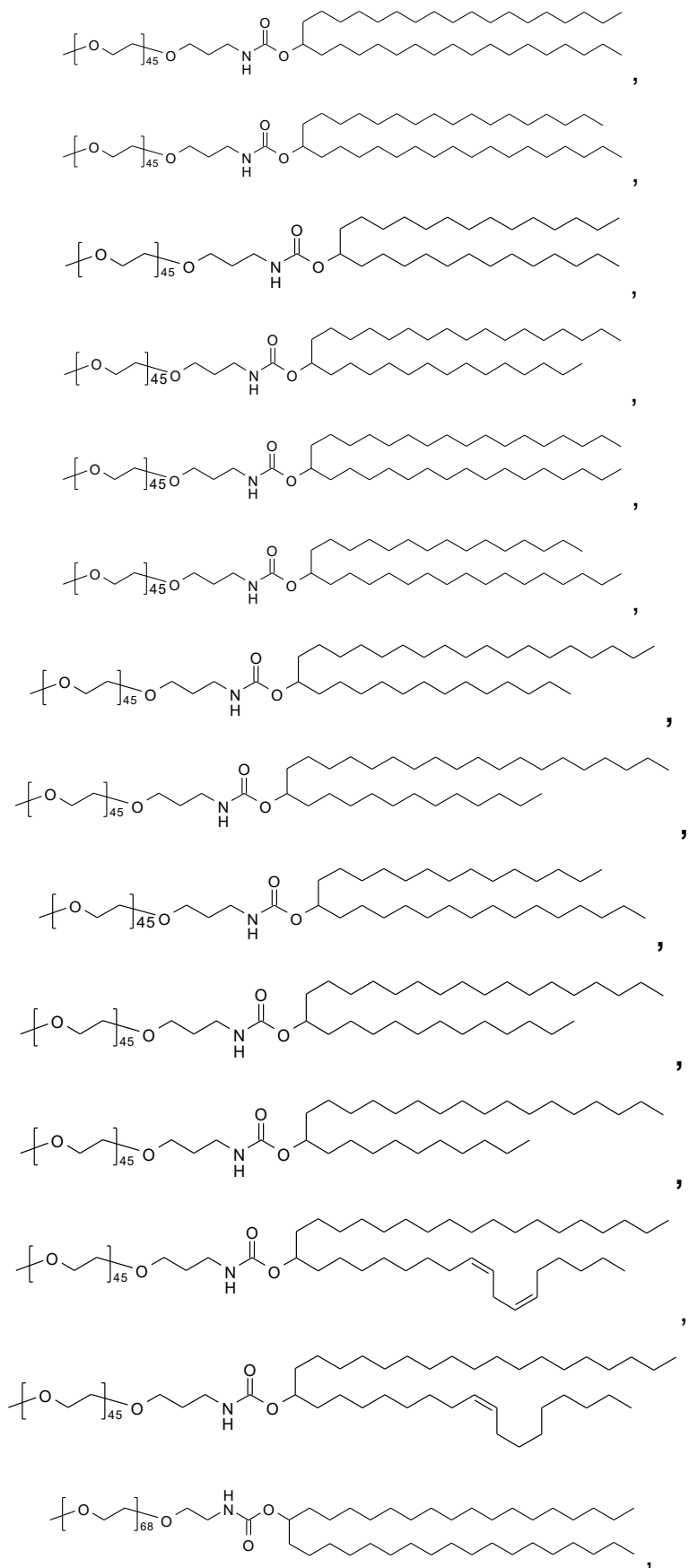
n é um grau de número médio de polimerização entre 10 e 200 unidades de PEG;

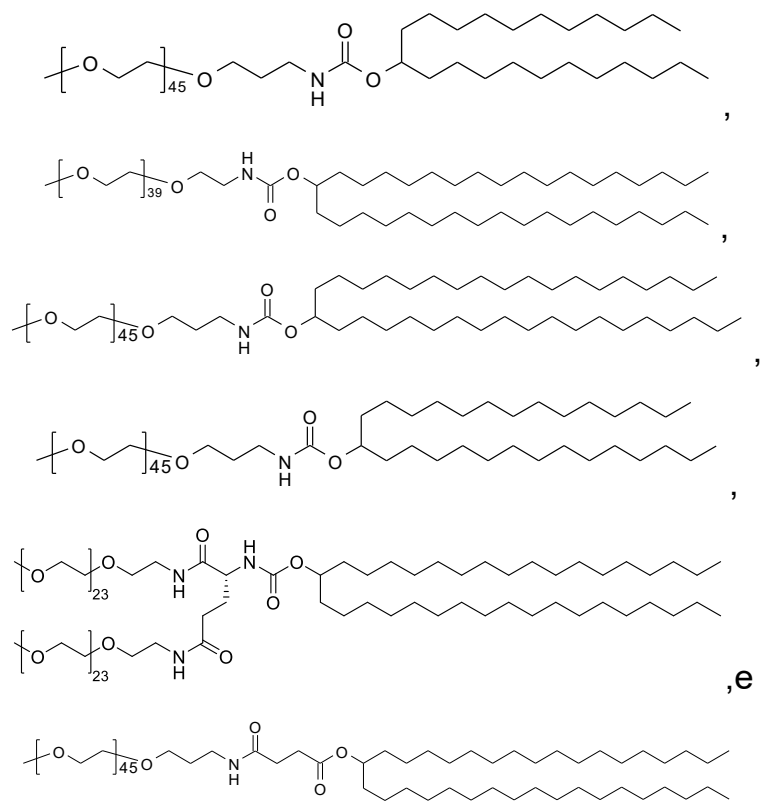
L_1 é um ligante de C_{1-10} heteroalquilenos opcionalmente substituído, contendo um, dois ou mais de um éster, succinato, carbamato, carbonato, cetona, carbonil, uréia, amina, amida, imina, tioéter, xantato e fosfodiéster; qualquer um deles pode ser substituído por zero, um ou mais grupos de PEG;

X_1 e X_2 são selecionados independentemente dentre carbono ou oxigênio; e

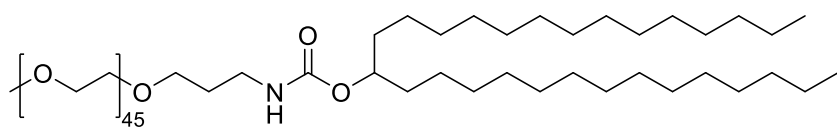
A_1 e A_2 são selecionados independentemente de uma C_{6-30} alquila, C_{6-30} alquila e C_{6-30} alquila, sendo que A_1 e A_2 podem ser o mesmo ou diferente.

3. Lípideo furtivo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de que é selecionado dentre:





4. Lípideo furtivo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, ou um sal farmacologicamente aceitável, caracterizado pelo fato de que é:



5. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um ou mais lípideos furtivos, como definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, ou um sal farmacologicamente aceitável dos mesmos, e ainda um agente biologicamente ativo.

6. Composição, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que o referido agente biologicamente ativo é selecionado de um RNAi, um siRNA, um inibidor do RNAi, um miRNA, um siRNA e um shRNA.

7. Composição, de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um veículo farmacologicamente aceitável.

8. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações

5 a 7, caracterizada pelo fato de que é para uso em uma formulação para fornecimento de um agente biologicamente ativo para terapia.

9. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 7, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de um tumor ou de uma doença do fígado.